

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA JA VIROLOOGIA ÕPPETOOL

Mona Teppor

**Alfaviiruste replikaasi kompleksi struktuuri uurimine valkude
homoloogsete domeenide vahetamisega**

Bakalaureusetöö

Juhendajad MD, DSc Eva Žusinaite

PhD Aleksei Lulla

TARTU 2014

SISUKORD

| | |
|--|----|
| SISUKORD | 2 |
| KASUTATUD LÜHENDID | 3 |
| SISSEJUHATUS | 4 |
| KIRJANDUSE ÜLEVAADE | 5 |
| 1. Alfaviirused | 5 |
| 1.1. Üldisloomustus | 5 |
| 1.2. SFV virion | 6 |
| 1.3. SFV genoom | 7 |
| 1.4. Mittestruktuursed valgud | 8 |
| 1.5. Infektsioonitsükkel | 9 |
| 1.6. Replikaasi kompleksi uurimine | 11 |
| 2. Valkude homoloogsete domeenide vahetamine | 12 |
| 2.1. Valkude modulaarsus | 12 |
| 2.2. Domeenide vahetamine | 13 |
| EKSPERIMENTAALNE OSA | 15 |
| 1. Töö eesmärgid | 15 |
| 2. Materjalid ja meetodid | 16 |
| 3. Tulemused ja arutelu | 23 |
| KOKKUVÕTE | 36 |
| SUMMARY | 37 |
| KASUTATUD KIRJANDUS | 39 |
| LISAD | 44 |
| LIHTLITSENTS | 45 |

KASUTATUD LÜHENDID

ah – aminohape

bp – *base pair*, aluspaar

CHIKV – Chikungunya viirus

CMC – *carboxymethyl cellulose*, karboksümetüülselluloos

CPE – *cytopathic effect*, tsütopaatiline efekt

CPV-I – *cytopathic vacuole type I*, I tüüpi tsütopaatiline vakuool

DTT – ditiotreitol

GMEM – *Glasgow Modified Eagle's Medium*

ICA – *infectious center assay*

icDNA – *infectious complementary DNA*, infektsiooniline komplementaarne DNA

kb – *kilobase*, kiloalus

m⁷G – 7-metüülguanosiin

nsP – *nonstructural protein*, mittestruktuurne valk

nt – nukleotiid

NTD – N-terminaalne domeen

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus

pfu – *plaque forming unit*, lüüsilaiiku moodustav ühik

polüA – polü-adenosiin

SDS – *sodium dodecyl sulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat

SFV – Semliki Forest viirus

sgRNA – subgenoomne RNA

SINV – Sindbis viirus

UTR – *untranslated region*, mittetransleeritav ala

wt – *wild type*, metsiktüüp

SISSEJUHATUS

Viirused on bioloogilised objektid elus ja eluta looduse piiril. Nad sisaldavad geneetilist materjali, paljunevad ja evolutsioneeruvad, kuid neil puudub rakuline ehitus ja iseseisvalt paljunemise võime, mistõttu neid ei peeta üldiselt elusorganismideks. Viirused on rakusisesed parasiidid ja nakatavad kõigi eluslooduse riikide esindajaid.

Alfaviiruste perekonna viirustel on üksikahelaline positiivse polaarsusega RNA genoom. Perekonnal on ligi 30 liiget, mis nakatavad kalu, linde, selgrootuid ja imetajaid, sealhulgas inimesi, ning kasutavad levimiseks lülialgseid vektoreid. Alfaviirused on oma suhteliselt lihtsa ehituse ja genoomi struktuuri tõttu viiruste uurimise mudelobjektid. Enim on iseloomustatud ja uurimistöodes kasutatud Semliki Forest viirust (SFV) ja Sindbis viirust (SINV).

Et mõista viiruste elutsüklit ja paljunemismehhanisme, on väga tähtis teada viirusvalkude struktuure ja funktsioone. Selleks on seni peamiselt analüüsitud valkudes tekitatud väikesemahuliste mutatsioonide mõju viirusele, kuid olulist uut infot on andnud ka valkude homoloogsete domeenide vahetamise ehk *swapping*'u meetod. *Swapping* tähendab konkreetse viirusetüve genoomis mingi valgudomeeni kodeeriva piirkonna asendamist mõne teise geneetiliselt lähedase viiruse homoloogse järjestusega. Seejärel võrreldakse saadud mutantviiruse omadusi metsiktüüpi viiruse ja teiste kimääridega ning tehakse järeldusi vahetatud osa ülesande ja interaktsioonide kohta.

Töö teoreetiline kirjanduse ülevaate osa iseloomustab SFV näitel alfaviiruste üldisi jooni, infektsioonitsüklit, replikaasi kompleksi valke ja nende uurimist. Teoreetilises osas tutvustatakse ka valkude homoloogsete domeenide vahetamise olemust, tähtsust ja võimalikke rakendusi. Eksperimentaalne osa kirjeldab alfaviiruste replikaasi kompleksi struktuuri uurimist homoloogsete domeenide vahetamisega. Arutelus lahatakse tulemuste tähendust ja pakutakse välja uusi töösuundi.

Käesoleva töö eesmärk on uurida alfaviiruste replikaasi kompleksi, kasutades valkude homoloogsete domeenide vahetamise meetodit, ja analüüsida selle uurimisviisi rakendusvõimalusi viroloogias.

Töö teostati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis RNA-viiruste uurimisgrupis osana alfaviiruste replikaasi uurimise projektist. Tänan Eva Žusinaitet parima juhendamise ja kõige muu eest ning Aleksei Lullat, kes on projekti idee autor ja põhitäitja ning andis palju kasulikku informatsiooni töö põhimõtte ja eesmärkide kohta.

Märksõnad: Alfaviirused, homoloogsete domeenide vahetamine, *swapping*, replikaasi kompleks.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Alfaviirused

1.1. Üldiseloostus

Alfaviiruste perekonna viirustel on üksikahelaline positiivse polaarsusega RNA genoom. Alfaviirused kuuluvad togaviiruste sugukonda koos rubiviirustega, mille ainus esindaja on punetisi põhjustav Rubella viirus. Alfaviiruste hulka kuulub ligi 30 liiki, mille genoomi suurus on 11–12 kilobasit (kb). Alfaviirused nakatavad nii imetajaid, linde, kalu kui ka selgrootuid, levides viimaste kaudu selgroogsetele pärisperemeestele.

Alfaviirused on geograafiliselt väga laialt levinud, neid leidub peaaegu kõikjal Maal peale mõne saare ja Antarktika. Leviku alusel jaotatakse alfaviirused Uue ja Vana Maailma viirusteks. Uue Maailma viirused, näiteks *Eastern Equine Encephalitis* viirus (EEEV), võivad põhjustada surmavat entsefaliiti. Vana Maailma alfaviiruste infektsioon on enamasti kergekujulisem, tekitades palavikku ning pea- ja liigesevalu. Tüüpviirused SFV ja geograafiliselt levinuim SINV on mõlemad Vana Maailma viirused. (Strauss ja Strauss, 1994) Kogu genoomi sekveneerimise andmete ja valgujärjestuste võrdlemine näitab, et käesolevas töös kasutatud kolme alfaviiruse seast on fülogeneetiliselt lähedasemad SFV ja Chikungunya viirus (CHIKV) ning SINV kuulub veidi kaugemasse harusse (Luers jt, 2005).

Alfaviiruseid levitavad lüljalgsed – nad on arboviirused (inglise keeles *arthropod + borne*). Looduses ringlevad alfaviirused lüljalgsete vektorite, kelleks on enamasti moskiitod, ja selgroogsete pärisperemeeste (imetajad, linnud, kalad) vahel. Selgrootud vektorid nakatuvad viirusega, kui nad hammustavad nakatunud peremeest. Selgrootute organismides on infektsioon asümptomaatiline. Pärast paljunemist vektori organismis kandub viirus moskiitohammustuse kaudu uuele selgroogsele peremehele, põhjustades tema organismis erinevaid haigusnähte. Pärisperemehe rakkudes lõpeb äge nakkus sageli raku surmaga. Paljud alfaviirused on võimelised nakatama ka inimesi ja on seetõttu inimkonnale ohtlikud patogeendid. (Schmaljohn ja McClain, 1996) Hiljuti on vallandunud mitmed Chikungunya viiruse epideemiad ja ennustatakse, et globaalse soojenemise tõttu suurenevad alfaviiruste vektorite areaalid (Schwartz ja Albert, 2010; Thiboutot jt, 2010). Seetõttu muutuvad need viirused üha laiemalt levinumaks ja niisiis oluliseks tervishoiuprobleemiks.

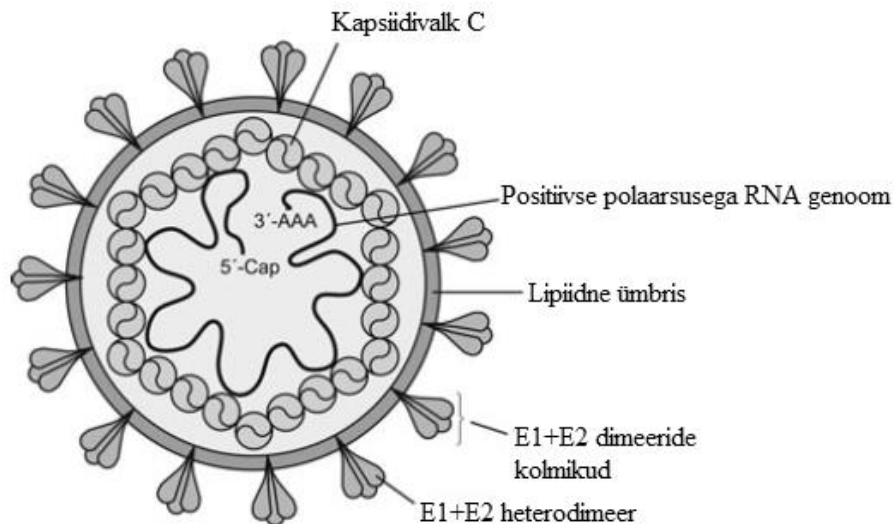
Alfaviirustel on lai peremeestering, nad suudavad nakatada väga paljusid erinevaid rakutüüpe ja nende genoomiga on lihtne manipuleerida, sellepärast kasutatakse neid laialdaselt uurimistöös, biotehnoloogias ja mudelobjektidena bioteadustes üldiselt. Kuna alfaviiruste struktuur on suhteliselt lihtne ja tüüpviiruste laboratoorsed tüved pole inimestele patogeensed,

uuritakse nende näitel teiste haiguseid tekitavate viiruste infektsiooni ja replikatsiooni molekulaarseid mehhanisme. Alfaviirused on head mudelid ka paljude bioloogia põhiprotsesside, nagu näiteks endotsütoosi ja membraanide kokkusulamise uurimiseks. Alfaviirustel põhinevad paljud ekspressioonivektorid, mida saab rakendada bio- ja geenitehnoloogias, näiteks kasutatakse SFV-l põhinevaid vektoreid heteroloogseks geenide ekspresseerimiseks eukarüootsetes rakkudes (Modrow jt, 2013).

Järgnevalt iseloomustatakse tüüpviiruse ja antud töö põhimaterjali SFV näitel lähemalt alfaviiruste virioni ehitust, genoomi struktuuri ja mittestruktuurseid valke. Ülevaade antakse ka viiruse infektsiooni- ja replikatsioonitsüklist ning alfaviiruste replikaasi kompleksi uurimisest.

1.2. SFV virion

SFV virionid on 65–70 nm diameetriga kerajad, veidi pleomorfseid struktuure. Virion koosneb nukleokapsiidist ja seda ümbritsevast lipiidsest kaksikkihist, mida läbistavad glükoproteiinid (Joonis 1). Genoomi ehk positiivse polaarsusega üheaahelalist 11,5 kb RNA molekuli ümbritseb 40 nm läbimõõduga kapsiid, mis on ikosaeedriline ehk kahekümne küljega. Kapsiid koosneb penta- ja heksameerideks koondunud 240 kapsiidivalgu (C) koopiast. Lipiidne ümbris pärineb peremeesraku plasmamembraanist ja on sellega niisiis koostiselt sarnane. Ümbrist läbistavad 240 viiruse toodetud E1 ja E2 glükoproteiinide heterodimeeri, mis kolmekaupa üksteise ümber keerdudes moodustavad ogataolisi struktuure (kokku 80). Ogade kaudu seostuvad virionid rakuliste retseptoritele ja samas seostuvad nendele ka viirust neutraliseerida võivad antikehad (Modrow jt, 2013). E1 ja E2 glükoproteiinid seostuvad membraaniga oma C-terminaalsete otstega. Glükoproteiinvõre on samuti ikosaeedriline ning võrdne kapsiidivalgu ja glükoproteiini molekulide arv (240) võimaldab nende vahel üks ühele interaktsioone. SFV virioni koosseisus on veel perifeerne väike valk E3. (Schmaljohn ja McClain, 1996; Strauss ja Strauss, 1994)



Joonis 1. SFV virion. Joonisel on näidatud SFV genoom (positiivse polaarsusega RNA molekul), millel on 5' *cap*-struktuur ja 3' polüA saba. Genoom ja kapsiidivalk moodustavad nukleokapsiidi. Seda ümbritseb lipiidne ümbris, mida läbistavad E1 ja E2 heterodimeeride ogataolised kolmikud. (Modrow jt, 2013, muudatustega)

1.3. SFV genoom

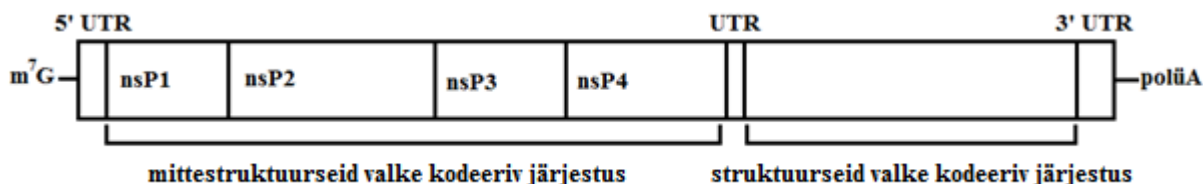
SFV genoom on 11 442 nukleotiidijäägi (nt) pikkune positiivse polaarsusega lineaarne üheaahelaline RNA molekul (Joonis 2). Täispika genoomse 42S RNA molekuli 5' otsas on 7-metüülguanosiini (m^7G) molekul (*cap*-struktuur) ja 3' otsas umbes 100 nt pikkune polüA (polü-adenosiin) järjestus ehk saba. Need järjestused on olemas ka rakulistel mRNA-del. (Modrow jt, 2013)

Genoom sisaldab kahte avatud lugemisraami (ORF, *open reading frame*): 5' poolne kaks kolmandikku genoomist kodeerib mittestruktuursete (nsP1–4, *nonstructural protein*), 3' poolne kolmandik struktuursete valkude (C, E1–3, abivalk 6K) eellasvalku. Mittestruktuursete ehk replikaasi kompleksi valkude eellasmolekul on umbes 2500 amihohapejäägi (ah) pikkune polüproteiin P1234, mis sünteesitakse genoomselt RNAlt. P1234 protsessitakse hiljem järkjärgult neljaks mittestruktuurseks valguks, mis koos moodustavad viiruse replikaasi. Iseseisvatel mittestruktuursetel valkudel on samuti erinevaid funktsioone, kuid polüproteiini protsessimise vaheühendid ja lõplik replikaasi kompleks sünteesivad genoomselt RNAlt negatiivset ahelat ning sellelt täispikka genoomset ja lühemat subgenoomset RNAd, mis on mõlemad positiivse polaarsusega.

Struktuurseid valke kodeerivalt järjestuselt sünteesitakse kirjeldatud vaheetappide kaudu esmalt subgenoomne 26S RNA (sgRNA) ahel, millel on sarnaselt genoomse RNAGA *cap*- ja polü(A) struktuurid, ning alles siis transleeritakse sellelt sgRNAlt struktuursete valkude 1253

ah pikkune eellasvalk. Seejärel protsessitakse saadud polüproteiin lõplikeks struktuurseteks valkudeks, millest koosneb SFV virion.

SFV genoomse RNA 5' ja 3' otsas on varieeruva pikkusega mittetransleeritavad UTR (*untranslated region*) järjestused, mis moodustavad sekundaarstruktuure; mittekodeeriv lühike järjestus on ka kahe lugemisraami vahel (Strauss ja Strauss, 1994). Need alad reguleerivad viiruse erinevate RNAd e sünteesi.



Joonis 2. SFV genoom. SFV genoom on positiivse polaarsusega üheaahelaline RNA molekul. 5' otsas on 7-metüülguanosiini molekul, 3' otsas polüA saba. 5' kaks kolmandikku genoomist kodeerib mittestruktureid valke ja 3' kolmandik struktureid valke. 5' ja 3' otstes ning kodeerivate lugemisraamide vahel on mittetransleeritavad UTR järjestused.

1.4. Mittestruktureid valgud

SFV nelja mittestruktureid valggu funktsioonid on suhteliselt hästi uuritud, kuid on veel lünki teadmistes nende omavaheliste interaktsioonide ja neist moodustunud replikaasi kompleksi omaduste kohta. Mittestruktureid valgud ja neist koosnevad ensüümid (sh replikaas) osalevad peamiselt viiruse RNA transkriptsioonis ja replikatsioonis.

nsP1 on 537 ah pikkune multifunktsionaalne valk, mille järjestus on togaviiruste sugukonnas väga konserveerunud (Modrow jt, 2013). See proteiin osaleb viiruse negatiivsete RNA ahelate sünteesis (Wang jt, 1991) ning genoomsele ja sgRNAle *cap*-struktuuri lisamises, töötades metüül- ja guanüülültransferaasina (Ahola jt, 1997). nsP1 kaudu seondub viiruse replikatsioonikompleks raku sisemembraanile, kusjuures membraanile seondumata ei suuda valk katalüüsida ei metüül- ega guanüülülühma ülekannet (Ahola jt, 1999).

nsP2 (799 ah) on samuti multifunktsionaalne ja on SFV üks tähtsamaid mittestruktureid valke. nsP2 karboksüterminaalsel domeenil ehk Pro domeenil on proteaasne aktiivsus: see lõikab mittestruktureid valkude eelpolüproteiini (P1234) (Ding ja Schlesinger, 1989; Vasiljeva jt, 2001; Merits jt, 2001). Keskmise osa kaudu osaleb valk NTPaasina (Rikkonen jt, 1994) ja RNA helikaasina RNA sünteesil (Gomez jt, 1999) ja lõikab RNA ahela 5' otsast ära γ -fosfaatühma, et nsP1 saaks seejärel sinna lisada *cap*-struktuuri (Vasiljeva jt, 2000). Kõige N-terminaalsem 180 aminohappest koosnev osa ehk N-terminaalne domeen (NTD) toetab arvatavasti nsP2 teisi funktsioone, näiteks on NTD vajalik proteaasi tööks, kuna seda domeeni muteerides ei tunne

proteas ära oma lõikekohti (Lulla jt, 2012). nsP2-1 on tuuma ja tuumakesse liikumise signaalid, mistõttu suur osa valgust asub just seal ja surub arvatavasti alla peremeesraku metabolismi (Rikkonen jt, 1992).

nsP3 (482 ah) on fosfoproteiin (Peränen jt, 1988), mille täpsed ensümaatilised funktsioonid ja töömehhanism pole veel täielikult selged. Valk on vajalik viiruse negatiivse ahela transkriptsiooniks ja ilma nsP3-ta ei moodustu replikatsioonikompleksi (Strauss ja Strauss, 1994; Wang jt, 1994). Kui deleteerida või muteerida fosforüleeritavad aminohappejäägid, langeb küll SFV patogeensus, aga viirus jääb siiski elujõuliseks ja replikatsioonivõimeliseks (Vihinen jt, 2001). Valgu C-terminaalne domeen varieerub alfaviiruste seas nii järjestuselt kui pikkuselt, kuid N-terminaalne aminohappeline järjestus on väga konserveerunud (Strauss jt, 1988). nsP3 N-terminuse kõige äärmist osa nimetatakse makro-domeeniks ja see on oluline viiruse replikatsiooni ja virulentsuse tagamiseks (Park ja Griffin, 2009), kuid selle domeeni täpne ülesanne ja töömehhanism on teadmata.

nsP4 (614 ah) on viiruse RNA sõltuv RNA polümeraas ja sünteesib nii negatiivset ahelat kui ka subgenoomset ja genoomset RNAd (Modrow, 2013). nsP4 järjestus on alfaviiruste seas väga sarnane, kusjuures lähedase struktuuriga valke on leitud isegi fülogeneetiliselt kaugetel taimeviirustel (Kamer ja Argos, 1984). Vabas olekus valku leidub nakatunud rakus teiste mittestruktuursete valkudega võrreldes palju vähem: nsP4 on üksi ebastabiilne, kuna see lagundatakse kiiresti N-otsa reegli alusel ubikvitinüleerimise rajas (Gonda jt, 1989; de Groot jt, 1991; Takkinen jt, 1991). Proteiin stabiliseeritakse replikaasi kompleksi koosseisus (Takkinen jt, 1991).

1.5. Infektsioonitsükkel

Infektsiooni algus

Viirus siseneb rakku retseptor-vahendatud endotsütoosil kaetud vesiikulite kaudu, kusjuures membraanide liitumiseks peavad endosoomid olema happeliselt laetud ja sisaldama kolesterooli. Happeline keskkond vallandab E1 ja E2 glükoproteiinides konformatsioonilised muutused, mille tagajärjel viiruse ümbris ühineb endosoomi membraaniga ja nukleokapsiid vabaneb tsütoplasmasse. (Helenius jt, 1980; Marsh jt, 1983; Modrow jt, 2013) Järgmisena seovad raku ribosoomid kapsiidivalgu, mis kiiresti lagundatakse, ja viiruse genoomne RNA vabaneb (Singh ja Helenius, 1992). Seda kasutatakse mRNAna mittestruktuursete proteiinide eellasvalgu P1234 sünteesiks. Polüproteiin lõigatakse nsP3/4 vahekohast ja vabaneb viiruse polümeraas nsP4 (Takkinen jt, 1991). Vaba nsP4 vajatakse viiruse RNA replikatsiooniks ning ilma seda etappi läbimata ei ole viirus elujõuline (Shirako ja Strauss, 1994).

Replikatsioonitsükkel

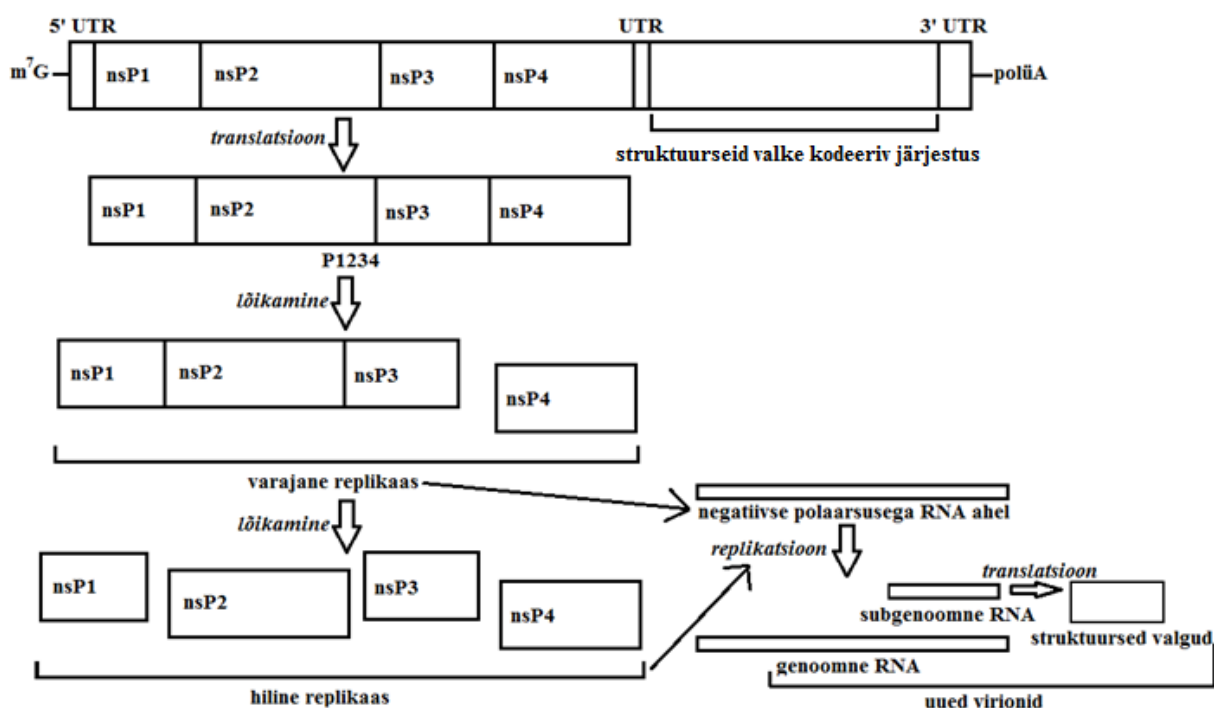
SFV replikatsiooniks seondub viirus nsP1 kaudu rakulistele membraanidele (Salonen jt, 2005). Esmase töötlemise käigus vabanenud P123 ja nsP4 moodustavad varajase replikatsioonikompleksi ja sünteesivad viiruse genoomselt RNAlt negatiivse RNA ahela (Sawicki ja Sawicki, 1980; Shirako ja Strauss, 1994) (Joonis 3). See reaktsioon on lühiajaline ja translatsioonist sõltuv, sest samal ajal jätkub mittestruktuurse polüproteiini translatsioon ning kui nsP2 hulk kasvab, hakkab see proteaas autokatalüütiliselt P123 eellasvalku lõikama (Peränen ja Kääriäinen, 1991). P123 protsessitakse lühikese elueaga vahevormide kaudu üksikuteks mittestruktuurseteks valkudeks nsP1–3 ja koos nsP4-ga tekib positiivseid ahelaid sünteesiv hiline replikaas (Joonis 3) (Takkinen jt, 1991; Shirako ja Strauss, 1994). See etapp ei sõltu enam mittestruktuurse polüproteiini juurdetekkimisest, sest substraadina kasutatakse juba varem valmistatud varajast replikaasi ja selle replitseeritud negatiivset ahelat. Neid molekule positiivsete polaarsustega RNAde sünteesi käivitumisel enam juurde ei tehta, seega sõltub nii genoomse kui subgenoomse RNA lõplik hulk varajase replikaasi faasi töötulemustest (Sawicki ja Sawicki, 1980).

Genoomne 42S RNA on viiruse täispikk RNA ning subgenoomset 26S RNAd, mis on struktuursete valkude mRNA, transkribeeritakse negatiivsel ahelal asuvalt sisemiselt promootorilt. Positiivse polaarsusega ahelaid sünteesitakse I tüüpi tsütoplasmaatilistes vakuoolides (*type I cytoplasmic vacuole*, CPV-I), mis on vesikulaarsed kareda tsütoplasmapõrgustikuga seotud endo- ja lüsoosomaalsed struktuurid (Froshauer, 1988). Vakuoolid moodustuvad ka ainult infektsioonilise RNAGA transfekteeritud rakkudes ehk virionidest sõltumatult (Peränen ja Kääriäinen, 1991). Viiruse replikaas on nende vakuoolidega seotud ning seal toimub arvatavasti nii RNA kui valkude süntees ja nukleokapsiidide pakkimine (Froshauer jt, 1988). Vakuoolide pinnal on sissesopistused ehk sfäärulid, mis on seotud tsütoplasmaaga, ning just seal asuvad replikaasi kompleksiks kogunenud viiruse mittestruktuursed valgud (Kujala jt, 2001). CPV-I-d võivad ühineda plasmamembraaniga ja samas töödeldakse neid endosomaalselt ümber, nii et nad on rakus pidevas ringluses rakumembraani ja endosomaalse-lüsoosomaalse organelisüsteemi vahel (Kujala jt, 2001).

Partikli moodustumine ja väljumine

Subgenoomselt RNA ahelalt sünteesitakse struktuursete valkude eellane (Joonis 3). Seda lõikab kõigepealt autokatalüütiliselt polüproteiinis sisalduv kapsiidivalk C, mis seejärel vabaneb ja seondub ribosoomidega, enne kui interakteerub genoomse RNA pakkimissignaali ja moodustab nukleokapsiidi (Melancon ja Garoff, 1987; Söderlund ja Ulmanen, 1977; Frolova jt, 1997). Pärast esimest lõikamist paljastub järelejäänud liitvalgu lõigatud otsas

signaaljärjestus, mis saadab selle endoplasmaatilisele retiikulumile (Garoff jt, 1990). Edasi protsessivad valku juba rakulised signaalpeptidaasid, vabastades järgmisena E2 ja E3 liitvalgu p62, väikese mittestruktuurse 6K proteiini ja E1 struktuurivalgu; need valgud liiguvad signaaljärjestuste mõjul plasmamembraanile (Liljeström ja Garoff, 1991). Nüüd algab virionide pungumine: nukleokapsiid liigub plasmamembraanile struktuursete proteiinide juurde, seondub nendega ja moodustuvad uued vabanevad virionid; selleks protsessiks on vajalik kolesterooli olemasolu rakus (Lu ja Kielian, 2000). 6K proteiin osaleb pungumisel abivalguna ja permeabiliseerib membraane, kuid valmis virionides on teda vähe (Loewy jt, 1995; Sanz jt, 1994).



Joonis 3. SFV mittestruktuursete valkude translatsioon, protsessing ja uute virionide moodustumine.

Genoomselt RNAlt transleeritakse mittestruktuursete valkude eellane P1234 polüproteiin. See moodustab pärast P3/4 vahetusest lõikamist varajase replikaasi, mis sünteesib negatiivse polaarsusega RNA ahelat. Varajane replikaas lõigatakse üksikuteks mittestruktuurseteks valkudeks, mis moodustavad hilise replikatsioonikompleksi. Hiline replikaas sünteesib negatiivselt ahelalt genoomset ja subgenoomset RNAd. Subgenoomselt ahelalt transleeritakse struktuursete valkude eellane, see protsessitakse üksikuteks proteiinideks, mis moodustavad koos genoomse RNAGA uued virionid.

1.6. Replikaasi kompleksi uurimine

Replikaasi kompleksi struktuur ja täpne töömehhanism on tänapäeval alfaviiruste valdkonnas üks tähtsamaid uurimistemasid. Kuigi üksikute mittestruktuursete valkude ensümaatilisi aktiivsusi ja oletatavaid funktsioone viiruse elutsüklis on suhteliselt hästi iseloomustatud, jääb nende omavaheline interakteerumine ja sfäärulites toimuv siiani üldiselt ebaselgeks. Valkude rolli alfaviiruste infektsioonis on seni uuritud peamiselt punkt- või mõnenukleotiidiliste

mutatsioonide, sealhulgas deletsioonide tekitamisega huvipakkuvas valgus ning nende muutuste mõju kindlaks tegemisega; näiteks viitavad mõnes teises valgus vastusena ilmnenud kompensatoorsed mutatsioonid nende valkude lähema koostöötamise võimalikkusele. Eelnevad nsP-de kirjeldused põhinevadki enamasti just sellise metoodikaga uurimustel. Lisaks on replikaasi kompleksi või selle osade lokalisatsioon rakus kindlaks tehtud mõne piirkonna märgistamisel ehk *tagging* meetodiga.

Viroloogia mudelobjektide alfaviiruste replikaasi uurimine annab infot ka paljude teiste sarnaste viiruste elutsükli kohta ja on oluline nii meditsiiniliselt, evolutsiooniliselt kui ka biotehnoloogiliselt. Kuigi viiruse genoomi üksikute mutatsioonide viimine ja nende mõju analüüsimine on loonud hulgaliselt teadmisi, on selliste väikesemahuliste muutuste sobiva asukoha valimine ja genoomi täpne modifitseerimine suhteliselt töömahukas ja probleemne. Kuna näiteks SFV üle 11 tuhande aluspaarilises nukleotiidses järjestuses võib võimalikult tähtsat ja kasulikku uut infot pakkuvaid märklaudalasid olla väga palju, jätkub selliste uurimuste tegemine arvatavasti veel kaua. Mõne uue metoodika välja töötamine võib aga avada uusi suundi nii alfaviiruste kui üldiselt kõigi viiruste ja kõrgemategi objektide uurimisel. Üheks selliseks suure potentsiaaliga meetodiks ongi valkude homoloogsete domeenide vahetamine ehk *swapping*. Järgnevalt antakse ülevaade *swapping*'u üldpõhimõttest ja paljulubavatest plussidest.

2. Valkude homoloogsete domeenide vahetamine

Valkude homoloogsete domeenide vahetamine ehk *swapping* tähendab viiruse või ka mõne teise organismi mingi valgupiirkonna asendamist teisest lähedasest tüvest või liigist pärineva homoloogse järjestusega. Sellised ulatuslikud modifikatsioonid toimuvad DNA tasemel ja on oma sisult sarnasemad pigem kromosoom- kui punktmutatsioonidega. *Swapping* on oluline nii evolutsioonilisest seisukohast, kuna toimub ka looduslikus keskkonnas, kui ka suure rakendusväärtuse tõttu biotehnoloogias ja teadusuuringutes.

2.1. Valkude modulaarsus

Paljudel keerulistel võrgustikel – nii bioloogilistel kui tehisel – on kirjeldatud modulaarne struktuur, mis tähendab, et nad koosnevad funktsionaalsetest ühikutest ehk moodulitest, mille sees on üksikute liikmete vahel tihedamad sidemed võrreldes moodulitevaheliste sidemete hulgaga (Wang ja Zhang, 2007). Samasuguse ülesehituse tõendeid on leitud ka rakulistes struktuurides ja molekulaarsel, sealhulgas valgulisel tasandil (Wagner jt, 2007). Valkude puhul võib moodulite analoogiks pidada domeene, mis on samuti iseseisvalt suhteliselt funktsionaalsed ja tihedate domeenisiseste sidemetega üksused. Proteiinide modulaarset ehitust

iseloomustab veel asjaolu, et paljud sarnase struktuuri ja ülesandega valgud ja nende domeenid erinevad aminohappelise järjestuse poolest üksteisest märkimisväärselt (Trifonov ja Frenkel, 2009). Sellest tuleneb, et näiteks sekveneerimisandmete järgi valkude eesmärgi ennustamine ja selle alusel gruppidesse jagamine võib sageli osutuda ebatäpseks ja isegi ebaoluliseks. Seda enam peaks proteiinide omavaheliste suhete ja valgukomplekside toimimise uurimisel keskenduma konkreetse monomeerse koostise asemel pigem just domeenide kui funktsionaalsete ühikute kõrgema taseme struktuuri ja koostöö mehhanismide analüüsimisele.

Modulaarsuse eelised pole veel täielikult selged, on isegi näidatud, et selline eripära võib olla tekkinud lihtsalt evolutsiooni kõrvalproduktina, näiteks duplikatsioonmutatsioonide tulemusena, ning tegelik bioloogiline tähendus ja lisaväärtus üldsegi puudub (Wang ja Zhang, 2007). Vähem äärmuslikud teooriad, mille kujundamisel on analüüsitud erinevatest valdkondadest pärinevaid andmeid, väidavad siiski, et võrgustike selline struktuur on küll juhusliku mutageneesi vili, kuid on siiski mõjutatud ja suunatud keskkonnatingimuste poolt (Wagner jt, 2007); selline teooria langeb seega ühte laialdaselt tunnustatud üldise evolutsiooniteooriaga. Modulaarsus bioloogias võib tekkemehhanismist olenemata osutada oluliseks näiteks valkude muteerumisel ja omavahelises seondumises. Näiteks on leitud, et tehes suhteliselt suuremahulisi ümberkorraldusi ühes domeenis, mõjutab see küll modifitseeritud domeeni struktuuri, kuid teised moodulid, millega antud domeen interakteerub, muutuvad vähe või mitte üldse. Nii on terveid domeene isegi deleteeritud, häirimata oluliselt nendega seondunud üksuste struktuure ja koostist. (Reichmann jt, 2005)

2.2. Domeenide vahetamine

Kuna valkude domeenid on iseseisvalt suhteliselt täisväärtuslikult funktsioneerivad üksused ja samas ei too isegi suured ühe domeeni sisesed muutused kaasa kahjulikke kõrvalmõjusid teistele selle domeeniga suhtlevatele moodulitele, on domeenid küllaltki „mugav“ ühik modifitseerimiseks. Ka looduslikus keskkonnas toimub valkude evolutsioon tihti just domeeni tasemel, kuna üksikud punktmutatsioonid ei pruugi anda märgatavat efekti valgu funktsioonile ja on tihti isegi kahjuliku toimega. Domeenide vahetamise ehk *swapping*’u osalemist valkude evolutsioonis toetavad mitmed tõendid: näiteks leiab sarnaseid struktuurseid motiive paljude tänapäeval kaugete liikide valkudes, kuid samas on eri eesmärgi täitvate ja erineva ehitusega proteiine nii suur hulk, et selline varieeruvus ei oleks saanud tekkida sedavõrd lühikese aja jooksul ainult üksikute nukleiin- või aminohappeliste asenduste kuhjumisega (Ostermeier ja Benkovic, 2001). Nii võib *swapping*’ut uute valkude sündimisel vaadelda kui „geneetilist *shortcut*’i“ ehk otseteed, mis on olemuselt sarnane horisontaalse geeniülekandega. Domeenide vahetamisel ilmuvad uued kombinatsioonid ja kimäärsed valgud, millel võib olla täiesti uus

funktsioon; seega on *swapping* üks oluline valkude evolutsioonimehhanism (Ostermeier ja Benkovic, 2001).

Lisaks evolutsioonilisele tähtsusele uuritakse *swapping*'ut ka suure rakendusväärtuse tõttu. Erinevatest organismidest või liikidest pärinevaid domeene kombineerides võib saavutada algmaterjalist teistsuguste omadustega kimäärvalke. Selliseid konstrukte võib kasutada näiteks biotehnoloogias vektoritena või biomeditsiinis vaktsiinidena. Ka alfaviiruste puhul on selliseid eksperimente juba tehtud. Näiteks saadi Chikungunya viiruse ja teistest alfaviirustest pärinevate osade ühendamisel varasematest ainult Chikungunya kasutanud variantidest paremate omadustega vaktsiinikandidaat (Wang jt, 2008). Kimäärsed alfaviirused on aidanud paremini mõista ka erinevate domeenide rolli virulentsuses ja peremeesorganismi valikus (Tuittila jt, 2000; Saxton-Shaw jt, 2013). Niisiis võib domeenide vahetamisega astuda samme meditsiiniliselt oluliste avastuste suunas.

Käesoleva töö jaoks konstrueeritud SFV *swap*-mutantide analüüsimine annab loodetavasti uut ja kasulikku infot replikaasi kompleksi mittestruktuursete valkude interaktsioonide kohta, mida üksikute mutatsioonide tekitamise meetoditega seni täielikult lahti selgitada pole suudetud. Kombineeriti selliseid viiruseliike, mis on fülogeneetiliselt piisavalt lähedased, et eeldatavalt anda nakatamisvõimelisi kimääre. Kuigi siiani tehtud uurimused näitavad, et ühes domeenis mahukate ümberkorralduste tegemine ei pruugi kaasa tuua olulisi kompensatoorseid mutatsioone teistes valkudes või nende osades, võiks arvata, et olulisemaid interaktsioonikohtasid siiski häiritakse piisavalt, et neis jälgitavaid muutusi esile kutsuda. Sel viisil soovitaksegi leida need tulipunktid, mis on määrava tähtsusega alfaviiruse replikaasi kompleksi moodustumisel ja funktsioneerimisel. Kuna tööks kasutatakse *swap*-kimääre erinevate valgudomeenide suhtes ja nii fülogeneetiliselt lähedasemate (SFV ja CHIKV) kui kaugemate (SFV ja SINV) liikide vahel, annab üksikute viiruste elujõulisuse ja paljunemise dünaamika võrdlemine teadmisi domeenide tähtsuse, rolli ja omavaheliste suhete kohta alfaviiruste infektsioonis.

EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Töö eesmärgid

Alfaviiruste replikaasi üksikuid mittestruktuurseid valke on palju uuritud ja hästi iseloomustatud, kuid replikaasi kompleksi struktuur on siiani suhteliselt ebaselge. Seni peamiselt kasutatud üksikute mutatsioonide tekitamise ja selle mõjude analüüsimise meetodiga on küll leitud hulgaliselt olulist infot, kuid selliste eksperimentide planeerimine on töömahukas ja probleemiderikas. Antud töös kasutati replikaasi struktuuri uurimiseks valkude homoloogsete domeenide vahetamise meetodit ehk *swapping*'ut, millega on alfaviiruste kohta juba mõningaid uusi teadmisi saadud. SFV genoomis vahetati välja nelja replikaasi töös osaleva domeeni kodeerivad järjestused, võttes asendusjärjestused kas lähemas või kaugemas suguluses olevalt viiruselt. Nii saadi kaheksa *swap*-mutantset viirust, mille elujõulisust ja infektsioonidünaamikat käesolev töö võrdleb. Täpsemalt sooviti leida järgmist:

- 1) millised kimäärviirused on elujõulised, võimelised moodustama uusi virione ning nakatama eukarüootseid koekultuuri rakke;
- 2) missugune on nende viiruste infektsioonidünaamika;
- 3) kui palju ja milliseid kompensatoorseid mutatsioone tekib algselt keskmiselt või vähevirelentses viirustes adapteerimise käigus;
- 4) kuidas on eri mutatsioonikombinatsioonid seotud konkreetsete viirusekloonide elujõulisusega.

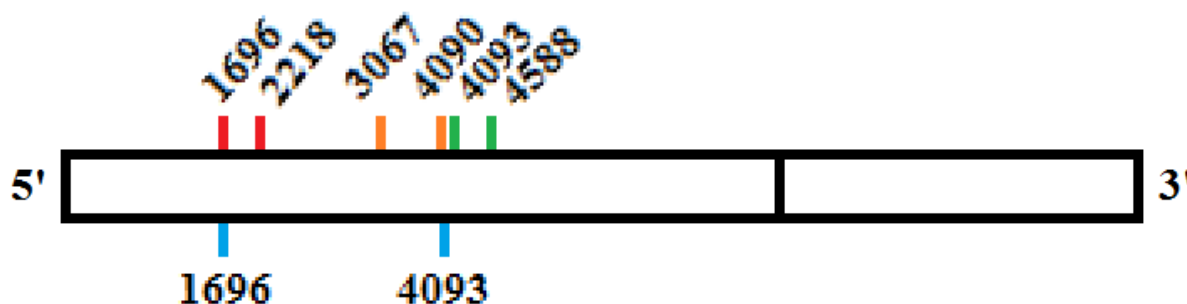
Lisaks sooviti eksperimentaalse töö tulemustest lähtuvalt iseloomustada homoloogsete domeenide vahetamise meetodi informatiivsust virooloogilistes uurimustes.

2. Materjalid ja meetodid

Kuna kogu uurimuse töömaht oli väga suur, on eksperimendid teostatud koostöös uurimisrühma teiste liikmetega.

Swap-viiruste icDNAd

Kõigi *swap*-mutantsete viiruste icDNAd olid konstrueeritud ja puhastatud Aleksei ja Valeria Lulla poolt. Infektsiooniliste kloonide icDNAd (*infectious complementary DNA*, infektsiooniline komplementaarne DNA) paljundati pSP6-SFV4 plasmiidis. Selles plasmiidis on lisaks SFV täispikale genoomsele järjestusele, milles olid vahetatud domeenid CHIKV-st või SINV-st, veel SP6 RNA polümeraasi promootor, ampitsilliini resistentsusgeen ja polü(A) järjestus. Vahetatavad domeenid olid valitud ja piiritletud samuti A. ja V. Lulla poolt. Kokku vahetati neli domeeni kodeerivat järjestust kas CHIKV või SINV homoloogset domeeni kodeeriva järjestuse vastu, seega oli erinevaid *swap*-viiruseid kokku 8. Vahetatud domeenid olid järgmised: kogu mittestruktuurne nsP2 valk; nsP2 N-terminaalne domeen NTD; nsP2 C-terminaalne proteaasi domeen Pro; nsP3 N-terminaalne makro-järjestus. Vahetatud järjestuste täpsed nukleotiidsed positsioonid SFV genoomis on näidatud joonisel 4. Viirused tähistati doonorliigi nime lühendi ja vahetatud domeeni lühendi kombinatsiooniga: CHIKV-nsP2, CHIKV-NTD, CHIKV-Pro, CHIKV-makro, SINV-nsP2, SINV-NTD, SINV-Pro, SINV-makro. Kõigi töös kasutatud icDNA-dega plasmiidide kaardid on esitatud lisas.



Joonis 4. Skemaatiline joonis vahetatud domeenide asukohast SFV genoomis. 5' kaks kolmandikku genoomist kodeerib mittestruktuursete valkude eellasvalku. Selles avatud lugemisraamis on tähistatud joontega ja näidatud numbritega vahetatud domeenide algus- ja lõpp-positsioonid nukleotiidses järjestuses. Sinine värv tähistab nsP2 domeeni (nukleotiidid 1696–4093); punane – NTD (1696–2218); oranž – Pro (3067–4090); roheline – makro (4093–4588).

Bakteritüved ja söötmed

icDNAd paljundamiseks kasutati *Escherichia coli* SURE kompetentsete rakkude tüve (*Stratagene*). Baktereid kasvatati 37 °C juures LB söötmes (10 g/l trüptooni, 10 g/l NaCl ja 5 g/l pärmiekstrakti) koos 100 µg/ml ampitsilliiniga.

Rakuliinid ja söötmed

Viiruste paljundamiseks, adapteerimiseks, tiitrimiseks ja virionide kogumiseks transfekeeriti *in vitro* sünteesitud RNAGA või nakatati viirusvarudega BHK-21 (*baby hamster kidney*, beebihamstri neerurakud) rakuliini. Rakke kasvatati 37 °C ja 5% CO₂ juures GMEM (*Glasgow Modified Eagle's Medium*, Gibco) söötmes koos 10% FBSi (*fetal bovine serum*, veise loote seerum, PAA), 200 mM HEPESe, 2% TPB (*tryptose phosphate broth*, trüptoos-fosfaat-puljong, Difco), 100 U/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiiniga. Nakatamisel kasutati seerumivaba 0,2% BSAGA (*bovine serum albumine*, veise seerumi albumiin, Sigma) söödett ehk nakatamissöödett; mõnes etapis kasutati ka 2% seerumiga GMEMi. Nakatamisel ja teistes katsetes inkubeeriti rakke samuti 37 °C juures 5% CO₂-ga inkubaatoris.

icDNA paljundamine

E. coli rakke transformeeriti plasmiidsete icDNAdega kuumašokiga, mis tekitati 42 °C juures 90 sekundi jooksul. Pärast paljundamist eraldati plasmiidid minipreparatsioonil kommertsiaalse kit'iga (*FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit*, Favorgen Biotech Corp.) või midipreparatsioonil kit'iga (*NucleoBond Xtra Midi*, Macherey-Nagel). Seejärel kontrolliti tulemusi restriksioonanalüüsiga geelelektroforeesil.

In vitro transkriptsioon

Järgnevas *in vitro* transkriptsiooniks lineariseeriti 4 µg DNAd restriksioonilise endonukleasiga *BcuI* ehk *SpeI* (*Thermo Scientific*) ning puhastati etanooliga sadestamisel. *In vitro* transkriptsiooniks kasutati *Promega* reagente. Transkriptsioonisegusse võeti rNTP segu (1 mM rATP, rCTP, rUTP ja 0,5 mM rGTP), 5 mM ditiotreitooli (DTT), 1× SP6 RNA polümeraasi puhvrit (400 mM HEPES-KOH pH 7,4; 60 mM magneesiumatsetaati; 20 mM spermiidiin-HCl), 1 mM *Ribo m⁷GpppG Cap Analog*'i, 50 ühikut ribonukleasi inhibiitorit, 30 ühikut SP6 RNA polümeraasi ja vett 50 µl-ni. Segusse lisati 1 µg lineariseeritud ja puhastatud DNAd ja inkubeeriti 37 °C juures 2 tundi. Sünteesitud RNA kogust ja kvaliteeti kontrolliti geelelektroforeesil.

BHK rakkude transfektsioon

In vitro transkriptsioonil sünteesitud RNA transfekeeriti BHK-21 rakkudesse elektroporatsiooniga. Konfluentseid rakke 100 mm diameetriga tassil pesti PBSiga (*phosphate buffered saline*, fosfaat-puhverdatud soolalahus; pH 7,4; sisaldab 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄ ja 10 mM Na₂HPO₄), koguti trüpsiini abil GMEMi söödett sisaldavasse 15 ml tuubi ja tsentrifuugiti *Eppendorf*'i 5810 R tsentrifuugiga põhja (5 minutit 20 °C ja 1000 rpm (*revolutions per minute*, pööret minutis) juures). Sööde eemaldati ja rakud suspendeeriti 800

μ l-s jääb hoitud PBSis. *BioRad* 4 mm elektrodide vahega küveti pipeteeriti 10 μ g sünteesitud RNAd ja segati rakkudega. Rakke elektroporeeriti kahe 850 V pulsiga 25 μ F juures *BioRad XceII Gene Pulser*’iga. Segust võeti 60 μ l, millest tehti lahjendused esmase *infectious center assay* jaoks. Ülejäänud segu külvati koos 8 ml söötmega 100 mm diameetriga tassile. Tasse inkubeeriti kas 24, 48 või 72 tundi kuni nähtava tsütopaatilise efekti tekkeni või selle puudumisel 72 tundi. Sööde ehk esmane viirusvaru koguti ja kasutati järgmisteks eksperimentideks; rakud lüüsiiti *western blot*’i jaoks, et kontrollida, millised viirusvalgud transfekteeeritud rakkudes sisaldasid.

BHK-21 rakkude nakatamine

BHK-21 rakkude nakatamiseks tehti kasutatavast segust meetodist olenevalt kas kümnekordsed või muud sobivad lahjendused nakatamisöötmes. Igast lahjendusest külvati enamikel juhtudel 350 μ l ~90% rakutihedusega 6-augustele plaatidele (iga auk 35 mm läbimõõduga), mida oli eelnevalt nakatamissöötmega pestud, ja inkubeeriti iga 10–15 minuti tagant loksutades, et vältida rakkude kuivamist. Tunni järel eemaldati nakatamissööde ja olenevalt meetodist lisati rakkudele söödet või selle segu.

Infectious center assay (ICA)

BHK-21 rakke nakatati 60 μ l transfektsioonisegu lahjendustega, misjärel valati aukudele 2% seerumisisaldusega GMEMi ja 2% CMC (*carboxymethyl cellulose*, karboksümetüülselluloos) 3:2 suhtega segu ja plaadid pandi 72 tunniks inkubaatorisse. Siis eemaldati segu rakkudelt ja auke värviti 30 minutit 0,25% kristallvioleti lahusega (lahuses veel 1,85% formaldehüüdi, 10% etanooli, 35 mM Trisi ja 0,5% CaCl_2), misjärel augud pesti sooja veega. Aukudes nähtavaks muutunud lüüsilaigud loendati ja saadud arvude põhjal arvutati pfu-de (*plaque forming unit*, lüüsilaiku moodustav ühik) hulk ühe mikrogrammi viiruse RNA kohta.

ICAd tehti kaks kordust (koos eelneva transfektsiooniga).

Western blot

Viirusvalkude sisaldust poreeritud rakkudes tuvastati *western blot*’iga. Rakud tassil pesti kaks korda PBSiga, lüüsiiti 200 μ l-s Laemmli puhvril (50 mM TrisHCl pH 6,8; 100 mM DTT; 2% SDS (*sodium dodecyl sulphate*, naatriumdodetsüülsulfaat); 10% glütserool; 0,1% broomfenoolsinine) ja saadud lüsaati kuumutati 10 minutit 100 °C juures. 10 μ l lüsaati kanti polüakrüülamiidgeelile, mis sisaldas 10% SDSi ja lahutati SDS-PAGE’il (SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforeesil) 1 \times SDS puhvril (koostisega 0,125 M Tris; 0,9 M glütsiin; 0,5% SDS). Lahutatud valgud kanti 45 minuti jooksul 10 V juures geelilt üle

nitrotselluloosfiltrile (GE *Healthcare*); nii geeli kui filtrit hoiti eelnevalt *semi-dry* ehk poolkuiva ülekandmise puhvris (sisaldab: 48 mM Tris; 39 mM glütsiin; 0,037% SDS; 20% etanool). Ülekandeks kasutati *Bio-Rad*'i *Trans-Blot Semy-Dry* masinat. Valkudega filtrit blokeeriti 5% lõssipulbri lahusega *western blot*'i pesupuhvris (50 mM TrisHCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20) üleöö 4 °C juures või toatemperatuuril 1 tund. Siis inkubeeriti filtrit primaarse antikehaga 2% lõssipulbri lahuses 1 tund ja pärast seda pesti filtrit 3 korda 10 minuti jooksul *western blot*'i pesulahusega. Järgmisena hoiti filtrit 1 tund sekundaarse antikehaga 2% lõssipulbri lahuses ja pesti filtrit jällegi 3 korda 10 minuti jooksul pesulahusega.

Kasutatud primaarsed polükloonaalsed küülikus toodetud antikehad ja nende vastavad lahjendused olid järgmised: anti-SFV-kapsiid 1:10000; anti-SFV-nsP1 1:10000; anti-SFV-nsP3 1:10000; anti-CHIKV-Pro (proteaasne domeen nsP2 C-terminuses) 1:10000; anti-CHIKV-Hel (helikaasne domeen nsP2 N-terminuse ja proteaasi vahel; tunneb ära NTD'd) 1:10000; anti-CHIKV-nsP3 1:2000; anti-SINV-nsP3 1:10000; anti-SINV-Pro 1:5000. Sekundaarne antikeha oli 1:10000 lahjendusega küüliku immunoglobuliinide vastane kitse igG, millega konjugeeritud peroksüdaasi signaali pärast *western blot*'i detekteeriti. Selleks kasutati GE *Healthcare*'i ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) tuvastamise kit'i. Signaal filtrilt eksponeeriti röntgenfilmile.

Teisene nakatamine esmaste viirusvarudega ja lüüsilaiik-tiitrimine

BHK-21 rakke nakatati esmaste viirusvarudega, kasutades kümnekordsete lahjenduste asemel 100 µl viirusvaru ja 250 µl nakatamissöötme segu. Pärast nakatamist pipeteeriti rakkudele 2 ml GMEMi ja tassid pandi inkubaatorisse. 24 ja 48 tunni pärast vaadeldi ja dokumenteeriti tsütopaatilise efekti ulatus. Kui see efekt oli nähtav või selle puudumisel 48 tunni möödudes koguti tassidelt teisene viirusvaru ja rakud lüüsi eelpool kirjeldatud Laemmli puhvriga. Viirusvalkude olemasolu rakulüsaadis kontrolliti *western blot*'iga sama protokoll järgi ja samade antikehadega.

Lüüsilaiik- ehk *plaque*-tiitrimiseks nakatati BHK-21 rakke esmaste viirusvarude 10-kordsete lahjendustega ja pandi rakkudele seejärel GMEM-CMC segu (täpne koostis toodud ICA kirjelduses). Plaat inkubeeriti ~90 tundi või 5 ööpäeva olenevalt viiruse elujõulisusest, mille hindamine põhines eelmiste katsete tulemustel. Siis värviti rakke 30 minutit kristallvioleti lahusega ja loendati lüüsilaiikude arv, mille põhjal arvutati viiruse tiiter ehk keskmine pfu'de arv ühes milliliitris esmases viirusvarus.

Esmaste viirusvarudega nakatamise kasvukõverad

Kasvukõverate tegemiseks nakatati BHK-21 rakke 35 mm diameetriga tassidel esmaste viirusvarudega $MOI = 0,1$ tingimustes (*multiplicity of infection*, infektsiooni kordsus) ehk kümne raku kohta võeti 1 nakatav osake. Rakud loendati samasuguse tihedusega paralleelselt tassilt, saadud arvu põhjal arvutati vajaminev pfu'de hulk ja edasi ka vajalik viirusvaru maht (esmaste viirusvarude tiitrimise tulemuste järgi). Rakke nakatati 200 µl kogumahuga viirusvaru ja nakatamissöötme seguga ja pärast söötme eemaldamist pesti rakke kaks korda nakatamissöötmega, et eemaldada kõik kinnitumata virionid. Seejärel lisati rakkudele 1 ml 2% seerumiga GMEMi ja pandi uuesti 37 °C juurde; siit algas kasvukõvera ajapunktide arvestamine. Et lasta veel kinnitumata jääda võinud virionidel rakkudesse siseneda, võeti esimene „0 h“ ajapunkt poole tunni pärast, kogudes rakkudelt ära kogu 1 ml söötme ja lisades 1 ml värsket 2% GMEMi. Sama protseduuri korraldati 3, 6, 9, 12, 24 ja 48 tunni pärast. Kogutud proovid säilitati –80 °C juures.

Kasvukõvera jooksul kogutud viirusvarud tiitriti eelnevalt kirjeldatud lüüsilaik-tiitrimise meetodil, kuid hilisemate ajapunktide tiitrimisel nakatati rakke suuremate viirusvaru lahjendustega (olenevalt viiruse elujõulisusest, mida hinnati esmaste viirusvarude tiitrimise tulemuste põhjal, kasutati viimastes ajapunktides kuni 10^{-9} lahjendusi). Lüüsilaigud loendati ja andmetöötlusprogrammis *Microsoft Excel* konstrueeriti viiruste kasvugraafikud.

Esimese viiruspõlvkonna adapteerimine

Pärast transfektsiooni kogutud esmastest viirusvarudest kasutati nakatamiseks kümnekordseid lahjendusi alates 10 µl kuni 10^{-4} µl viirusvaru sisaldusest nakatamissöötmega 350 µl lõppmahuni viidud segus. Nakatamisjärgselt ei eemaldatud söödet, vaid inkubeeriti rakke edasi. 24 tunni pärast vaadeldi rakke mikroskoobiga ja valiti väikseima viirusvaru sisaldusega auk ehk suurim lahjendus, milles tsütopaatiline efekt ehk CPE (*cytopathic effect*) oli nähtav. Sellest august koguti viirusvaru ja nakatati samamoodi uusi BHK-21 rakkudega plaate. Viirusvaru kogumist ja sellega nakatamist korraldati veel neli korda ja pärast viiendat nakatamist ja inkubeerimist koguti ühest nähtava tsütopaatilise efektiga lahjendusest viirusvaru.

Adapteeritud viiruste varudega nakatamine ja lüüsilaikudest puhastamine

Adapteeritud viiruste kogutud varudega nakatati BHK-21 rakke, millele pipeteeriti nakatamisjärgselt 2 milliliitrit 43 °C juures hoitud agari ja 2% seerumiga GMEMi segu (sisaldab 3 ml 4% agarit ja 10 ml 2% GMEMi). Rakke inkubeeriti 48 tundi, misjärel lisati eelmise kihi peale uus kiht 1 ml 1% agarit koos 1:320 lahjendatud neutraalpunasega ja pandi rakud sama temperatuuri juurde. 8–12 tunni pärast võeti aukudest pipetiotsikuga välja

lüüsilaiгу kohal olev segu, kuhu olid vabanenud virionid nakatatud rakkudest. Ühe viiruse kohta eraldati ~20 segutükki, mis suspendeeriti ~70% rakutihedusega BHK-21 rakkudega 24-auguste plaatide söötmes. Rakke hoiti 24 tundi inkubaatoris ning koguti sööde nendest aukudest, kus oli nähtav tsütopaatiline efekt. Iga viiruse kohta valiti 4 kloon, mille viirusvaru sajast mikrolitrist eraldati viiruse RNA *RNeasy Mini kit*-iga (*QIAGEN*).

Lüüsilaiгudest puhastatud viirusklonide pöördtranskriptsioon-PCR ja sekveneerimine

Sekveneerimise jaoks DNA saamiseks tehti pöördtranskriptsioon-PCR iga viiruse kohta neljast puhastatud kloonist. Kõigepealt segati kokku 5 µl 24-auguselt plaadilt puhastatud RNAs, 2 µl SR13 10 µM *antisense* praimerit (seondub positiivsele ahelale mittestruktuurseid valke kodeeriva järjestuse lõppu) ja 5 µl vett. Segu inkubeeriti 5 minutit 65 °C juures ja hoiti seejärel jääl 2 minutit. Siis lisati tuubi 4 µl 5× pöördtranskriptsiooni reaktsioonipuhvrit, 1 µl *Ribolock*'i *RNasin* ribonukleaasi inhibiitorit (20 u/µl), 2 µl 10 mM dNTPde segu ja 1 µl M-MuLV pöördtranskriptaasi (200 u/µl) (*First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific*). Reaktsioon toimus 42 °C juures 1 tund. PCRiga amplifitseeriti mittestruktuurseid valke kodeeriv järjestus, kasutades 13 praimeripaari, mis kokku katavad kogu soovitud ala genoomist ja millest iga vastastikku asuva paari kasutamisel saadakse ~700 bp (*base pair*, aluspaar) pikkune fragment. PCRi segu sisaldas 1× *DyNAzyme* puhvrit, 200 µM dNTPde segu, 400 nM *sense* ja 400 nM *antisense* praimerit, 1 ühik *DyNAzyme*II DNA polümeraasi (*Thermo Scientific*) reaktsiooni kohta, 2–5 µl pöördtranskribeeritud cDNAd ja vett kuni mahuni 50 µl. PCRi programm termotsükleril oli järgmine:

| | |
|--|--------------|
| Algne denaturatsioon 94 °C 3 min | |
| Denaturatsioon 94 °C 15 sekundit | |
| Praimerite seondumine 48 °C 15 sek | } korrati ×4 |
| Elongatsioon 72 °C 1 min | |
| 94 °C 10 sek | } ×35 |
| 55 °C 15 sek | |
| 72 °C 1 min | |
| Fragmentide lõpuni sünteetamine 72 °C 10 min | |

Pärast reaktsiooni lahutati soovitud produktid praimeritest ja muudest lühikestest fragmentidest geelelektroforeesil. Geelist lõigati välja ~700 bp fragment ja puhastati *kit*'iga (*NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel*). Sekveneerimiseks kasutati kommertsiaalset teenust ja iga reaktsioon tehti vastava *sense* või *antisense* praimeriga nende seast, millega oli teostatud PCR, nii et kogu mittestruktuurseid valke kodeeriv genoomi osa sai mõlemas suunas ~700 bp fragmentide kaupa sekveneeritud. Sekveneerimisandmeid analüüsiti programmiga *Bioedit*.

Lüüsilaukudest puhastatud viiruskloonide varude tiitrimine

Adapteeritud viiruste pärast viiendat nakatamistsükli kogutud varudest võeti tiitrimiseks nende kloonide varud, mille genoomis leiti sekveneerimisega huvipakkuvaid mutatsioonide kombinatsioone. Tiitrimiseks kasutati sama protokollu, mille järgi teostati esmaste viirusvarude lüüsilauk-tiitrimine, kasutades esmase viirusvaru asemel adapteeritud viiruste varu.

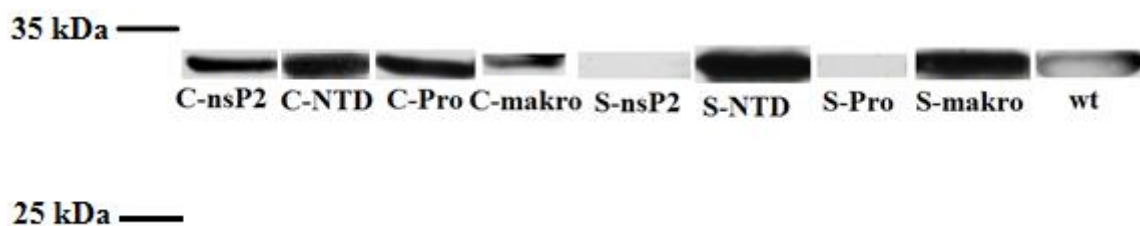
3. Tulemused ja arutelu

3.1. Swap-mutantsete viiruste elujõulisuse ja nakatamisvõime analüüs

Transfektsioon ja viirusvalkude olemasolu kontrollimine

Pärast *swap*-mutantsete viiruste icDNA plasmiididelt *in vitro* RNA sünteesimist transfekeeriti need RNAd BHK-21 rakkudesse. Rakke inkubeeriti ja kolme ööpäeva jooksul vaadeldi viiruste mõju rakkudele. Tsütopaatilise efekti ilmnemisel (rakud ümardusid ning tulid plastiku küljest ära) lüüsi rakud ja kontrolliti *western blot*'iga valitud viirusvalkude olemasolud rakkudes. Kõige kiiremini surid CHIKV-NTD'ga transfekeeritud rakud – lüüsi 24 tundi pärast infektsiooni. 48 tundi inkubeeriti ja seejärel lüüsi CHIKV-Pro ja CHIKV-makro tasse ning ülejäänud viiruste puhul esines tsütopaatiline efekt 72 tunni pärast, välja arvatud SINV-Pro ja SINV-nsP2, mis ei muutnud rakkude morfoloogiat. Kõik ülejäänud rakud lüüsi olenemata tsütopaatilise efekti olemasolust 72 tunni möödudes.

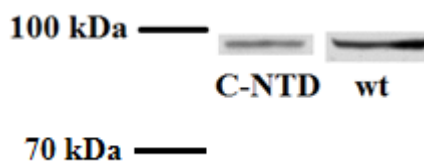
Western blot'iga kontrolliti esiteks SFV kapsiidivalgu sisaldust rakkudes, mis näitab uute virionide teket ehk seda, et viirus on võimeline rakus paljunema. Kapsiidivalk oli olemas kõigis viirustes peale SINV-Pro ja SINV-nsP2 (Joonis 5), mis järelikult ei suutnud läbida täielikku infektsioonitsükli. Mittestruktuursete valkude sünteesimise kontroll tehti SFV nsP1 vastase antikehaga ning see andis samasugused tulemused – SINV-Pro ja SINV-nsP2 ei olnud võimelised mittestruktuurseid valke detekteeritaval hulgal tootma, seega oli puudulik kogu nende replikatsioonitsükel.



Joonis 5. Western blot SFV kapsiidivastase antikehaga. SFV kapsiidivalk sisaldus kõigis viirustes peale SINV-nsP2 ja SINV-Pro. Kõrval näidatud wt-kontroll. S, C ja wt joonisel tähistavad vastavalt SINV-d, CHIKV-d ja SFV metsiktüüpi. SFV kapsiidivalgu molekulmass on ~33 kDa.

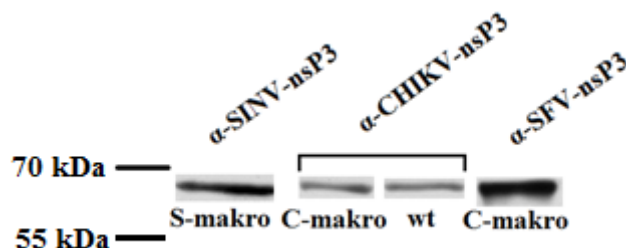
Swap-viiruste spetsiifilisi valke kontrolliti erinevate SFV, CHIKV ja SINV valkude vastaste antikehadega. SINV-Pro ja SINV-nsP2 ei andnud signaali ühegi antikehaga. Kuna SINV NTD vastast antikeha kasutamiseks olemas polnud, inkubeeriti seda domeeni sisaldavaid proove SINV proteaasi vastase antikehaga; see reaktsioon andis oodatult negatiivse tulemuse. CHIKV proteaasi vastane antikeha tehti kindlaks CHIKV-Pro toodetud valk ning CHIKV-NTD ja CHIKV-nsP2 valkude olemasolu detekteeriti CHIKV helikaasi vastase antikehaga, mis peaks

seonduma just nsP2 ja NTD domeenidega. Mõlemal juhul see nii oligi, tuli välja ka kasutatud polüklooraalse antikeha ristreaktiivsus SFV wt nsP2-ga (näidatud joonisel 6), mis võib viidata CHIKV ja SFV valkude suurele sarnasusele.



Joonis 6. Näiteid *western blot*'ist Chikungunya helikaasi vastase antikehaga. Lisaks seandumisele CHIKV-NTDd sisaldava nsP2-ga detekteerib see Chikungunya helikaasi vastane antikeha ka SFV wt nsP2 valku. C ja wt tähistavad vastavalt CHIKV-d ja SFV metsiktüüpi. SFV wt nsP2 valgu molekulmass ~86 kDa.

Vahetatud makro-domeeniga viiruste puhul kasutati kolme eri viiruse nsP3 vastaseid antikehi (Joonis 7). SIN-makro reageeris anti-SINV-nsP3 antikehaga, kuid mitte SFV nsP3 vastase antikehaga. CHIKV-makro kontrollimisel ilmnis jällegi Chikungunya- ja SFV vastaste antikehade ristreaktiivsus mõlema viirusega: anti-CHIKV seondus nii CHIKV kui SFV makro-domeeni sisaldava nsP3-ga ja SFV nsP3 vastane antikeha andis signaali CHIKV-makro suhtes.



Joonis 7. Näiteid *western blot*'idest eri viiruste nsP3 vastaste antikehadega. SINV nsP3 vastane antikeha seondus SINV-makro-ga; CHIKV nsP3 vastane antikeha reageeris nii CHIKV kui SFV wt makro-domeeni sisaldava nsP3-ga ja CHIKV makro-domeeni tundis samas ära ka SFV nsP3 vastane antikeha. S, C ja wt joonisel tähistavad vastavalt SINV-d, CHIKV-d ja SFV metsiktüüpi. SFV wt nsP3 valgu molekulmass on ~60 kDa.

Virulentsuse mõõtmine

Transfekteeritud rakkudega tehti virulentsuse mõõtmiseks ICA, mille tulemused ehk pfu'de arv ühe mikrogrammi viiruse RNA kohta ja lüüsilaiude kuju on kirjeldatud tabelis 1. ICAd tehti kaks kordust – esimesel korral transfekteeriti ja külvati rakke ristsaastumise vältimiseks iga viirusega eraldi päeval, tehes iga päev sama ka SFV *wild type* kontrolliga. Teise korduse puhul külvati kõik 8 eri kimääriga transfekteeritud plaadid ühel päeval koos ühe wt kontrolliga. Tulemused lähevad hästi kokku sellega, et SINV-Pro ja SINV-nsP2 ei olnud võimelised replitseeruma ja uusi rakke nakatama, sest lüüsilaike nad ei moodustanud. Samas ei teinud seda ka mõned teised viirused – esimeses ICAs CHIKV-nsP2, CHIKV-Pro ja SINV-makro. Kuna

aga kõigi nende viirustega transfecteeritud rakkudes ilmnes tsütopaatiline efekt, rakulüsaatides sisaldus detekteerimiseks piisavalt viirusvalke ja SINV-makro tekitas teises ICAs siiski väga vähe lüüsilaike, võib hüpoteesida, et lüüsilaigud ei jõudnud selle aja jooksul lihtsalt silmaga nägemiseks piisavalt suureks muutuda. CHIKV-NTD ja CHIKV-makro virulentsus oli võrreldav wt SFVga, sest nad moodustasid umbes sama palju või isegi rohkem lüüsilaike ning CHIKV-makro lüüsilaikude kuju oli samuti wt sarnane. SINV-NTD moodustas suhteliselt vähe lüüsilaike ja nende morfoloogia oli wt viiruse lüüsilaikudest suhteliselt erinev.

Tabel 1. *Swap*-mutantsete viiruste ICA tulemused. Kahes esimeses tulbas on näidatud esimese ICA tulemused – muteeritud viiruse ja paralleelse SFV wt kontrolli lüüsilaikude arv ja *swap*-viiruse lüüsilaikude kuju. Viimases tulbas on ICA korduse tulemused koos ühise SFV wt kontrolliga, mille lüüsilaikude arv oli 9×10^5 pfu/ μ g.

| | viiruse pfu/μg; lüüsilaikude kuju | wt pfu/μg | viiruse pfu/μg; wt = 9×10^5 pfu/μg |
|-------------|---|---------------------------------|---|
| CHIKV-nsP2 | lüüsilaike polnud | $1,7 \times 10^6$ | lüüsilaike polnud |
| CHIKV-NTD | $5,7 \times 10^5$ väikesed, ümarad | $1,5 \times 10^6$ | $2,2 \times 10^6$ |
| CHIKV-Pro | lüüsilaike polnud | $1,9 \times 10^6$ | lüüsilaike polnud |
| CHIKV-makro | $1,8 \times 10^6$ wt sarnased | $1,2 \times 10^6$ | $3,6 \times 10^4$ |
| SINV-nsP2 | lüüsilaike polnud | 1×10^6 | lüüsilaike polnud |
| SINV-NTD | $2,4 \times 10^2$ väikesed, kriipsukujulised | 9×10^5 | 2 |
| SINV-Pro | lüüsilaike polnud | $1,3 \times 10^6$ | lüüsilaike polnud |
| SINV-makro | lüüsilaike polnud | 1×10^6 | 2 |

Viiruste nakatamisvõime uurimine

Järgmisena analüüsiti viiruste infektsioonivõimet, nakatades BHK-21 rakke pärast transfectiooni kogutud esmaste viirusvarudega. Siingi vaadeldi tsütopaatilise efekti ilmnemist 24 ja 48 tundi pärast nakatamist. CHIKV-makro tekitas esimese ööpäevaga väga tugeva tsütopaatilise efekti ja rakud lüüsiti. SINV-Pro ja SINV-nsP2 varud ei suutnud rakke nakatada. Teiste viiruste nakkuse käik oli enam-vähem ühesugune: 24 tunni pärast oli näha väga väheseid infektsiooni märke ja umbes 10–15% rakkudest olid surnud, kuid 48 tundi hiljem ilmnes selge CPE ja rakud lüüsiti. Ka neid lüsaate kontrolliti *western blot*’il samade antikehadega ja saadud tulemused olid samad RNA transfectsioonist saadud rakulise materjali *western blot*’iga.

Järeldused viiruste elujõulisuse analüüsist

Transfektsiooni ja teisese nakatamise tulemuste põhjal võib järeldada, et Chikungunya viirusest võetud domeenidega viirused olid üldiselt edukamad Sindbis-kimäärdest. See tuleneb arvatavasti SINV ja SFV suuremast fülogeneetilisest kaugusest kui SFV ja CHIKV vahel – esimesel juhul on domeenide järjestustes rohkem erinevusi ja uue domeeni koostöö replikaasi teiste osadega vähem efektiivsem. Samas olid kaks Sindbise-SFV kimääri – makro ja NTD – siiski elujõulised, millest võib oletada, et nende domeenide konkreetsel järjestusel ei ole replikaasi toimimises niivõrd olulist rolli. Selle oletusega sobib hästi CHIKV vastavate domeenidega viiruste suurim infektsiooniedukus. SINV-nsP2 eluvõimetus on kooskõlas teadmistega SFV ja SINV pakkimissignaali kohta: nimelt asub signaaljärjestus, mille kaudu genoomne RNA kapsiidivalguga seondub, SFV-l nsP2 valgus, aga Sindbis viirusel nsP1-s (White jt, 1998; Frolova jt, 1997; Kim jt, 2011). Seega ei ole Sindbise nsP2-ga SFV genoomis enam pakkimissignaali ja isegi kui viirus suudab replitseeruda, ei suuda ta uusi virione moodustada ega järgmisi rakke nakatada. Kuna ka SINV-Pro ei paljunenud üheski katses, võib nende kahe viiruse defektsusest järeldada veel seda, et arvatavasti on Sindbise proteaas SFV ensüümist liiga erinev ja ei suuda õigesti lõigata mittestruktuursete valkude eellasvalku P1234, sest ei pruugi näiteks ära tunda õigeid lõikekohti polüproteiinis. Alfaviiruste proteaasi ja selle substraadi interaktsioonide uurimine on üks peamisi uurimissuundi alfaviiruste replikaasi alases teadustöös, nii et oleks huvitav välja uurida, millistes ja kui paljudes lõikamistes ensüüm defektne on ning missugused lõikekohtade järjestused sealjuures olulised ja vajalikud on. Chikungunya viiruse proteaasi ja täispika nsP2-ga viirused olid küll madala nakatamisvõimega, kuid siiski elujõulised.

Kõigi kuue elujõulise viiruse pärast transfektsiooni kogutud esmased viirusvarud tiitriti lüüsilaik-tiitrimise meetodil. Kontrolliks ja võrdluseks tiitriti SFV metsiktüüpi viiruse esmane viirusvaru. Saadud tulemused ehk viirusvarudes sisaldunud infektsiooniliste viirusosakeste arv ja tekkinud lüüsilaikude kuju on näidatud tabelis 2. Kuna ICAd tehes ei jõudnud mitme tegelikult nakatamisvõimelise viiruse lüüsilaigud 72 tunniga nägemiseks piisavalt suureks muutuda, inkubeeriti rakke seekord kauem ja saavutati loendatavad lüüsilaigud.

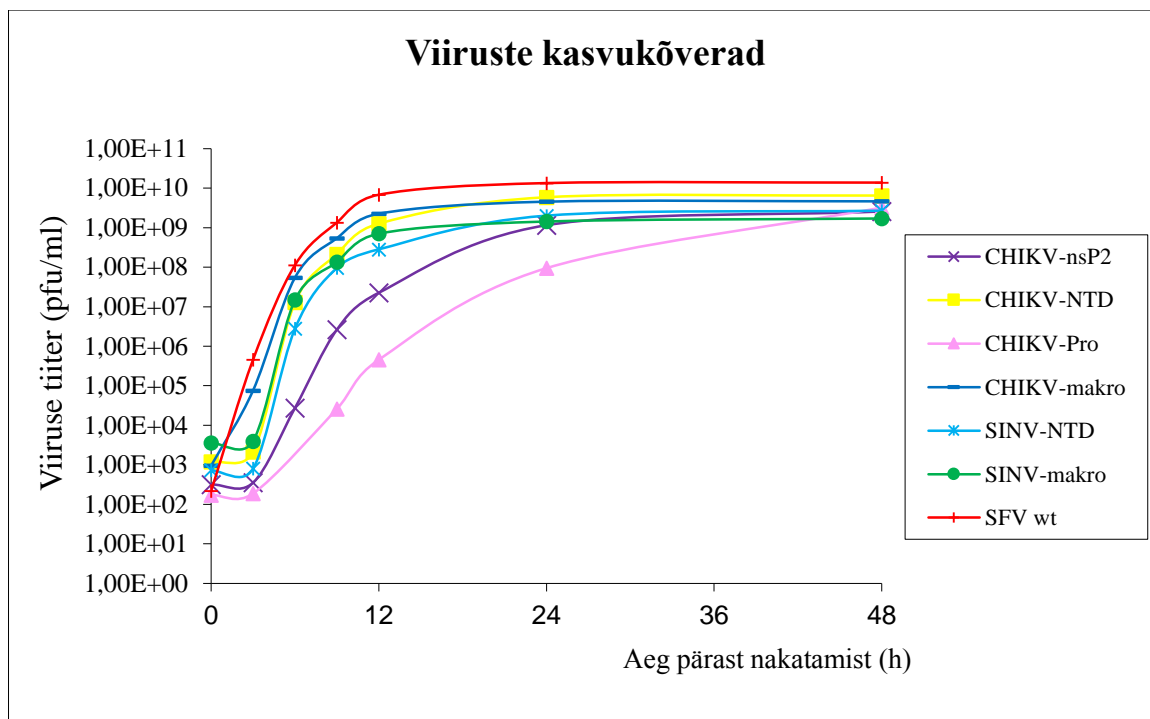
Tabel 2. Esmaste viirusvarude tiitrimise tulemused. Näidatud on viirusvarus sisaldunud infektsiooniliste osakeste arv ja lüüsilaikude suurus ning kuju kirjeldus.

| | viiruse tiiter pfu/ml; lüüsilaikude suurus ja kuju |
|-------------|---|
| CHIKV-nsP2 | $2,58 \times 10^7$ keskmised/väiksed; ümarad/nurgelised |
| CHIKV-NTD | $7,15 \times 10^6$ keskmised; korrapäratud |
| CHIKV-Pro | $1,58 \times 10^6$ keskmised/väiksed; korrapäratud |
| CHIKV-makro | $3,1 \times 10^7$ keskmised; korrapäratud |
| SINV-NTD | $9,35 \times 10^7$ keskmised/väiksed; ümarad/nurgelised |
| SINV-makro | 6×10^7 keskmised/väiksed; korrapäratud |
| SFV wt | $9,4 \times 10^8$ suured; ümmargused |

Tabelist on näha, et kõigi viiruste tiiter oli metsiktüüpi viiruse omast vähemalt suurusjärgu võrra väiksem ja enne kõige edukamaks osutunud CHIKV-makro ja CHIKV-NTD ei olnud nüüd sugugi kõige suurema tiitriga, kõrgeim tiiter oli hoopis samade domeenide SINV-*swap*'idel. Väikseim viirusosakeste arv oli CHIKV-Pro viirusvarus, mis näitab jällegi proteaasi domeeni vahetamise häirivat mõju viiruse infektsioonitsüklile. CHIKV-Pro, CHIKV-nsP2 ja SINV-makro-ga nakatatud rakke inkubeeriti teistest ööpäeva või kahe võrra kauem, kuna plaagid olid 90 tunni pärast loendamiseks veel liiga väikesed; plaagide suuruste selline erinevus võis veidi vähendada tulemuste omavahelist võrreldavust.

3.2. Viiruste infektsioonidünaamika võrdlemine

Viiruste infektsioonidünaamika hindamiseks konstrueeriti kasvukõverad, nakatades rakke kuue elujõulise viiruse esmaste viirusvarudega. Võrdluseks ja kontrolliks konstrueeriti ka SFV metsiktüübi kasvukõver. Esmaste viirusvarudega nakatatud BHK-21 rakkudel koguti 48 tunni vältel söödet ja aja jooksul sinna kogunenud viirusosakeste hulk tehti kindlaks lüüsilaik-tiitrimisega. Kasvukõverate graafikud on esitatud joonisel 8.



Joonis 8. Viiruste kasvukõverad. Joonisel on näidatud iga *swap*-viiruse ja SFV wt kasvukõverate graafikud pärast esmaste viirusvarudega nakatamist. Horisontaalteljel on aeg pärast nakatamist tundides ja püstteljel viiruse tiiter valitud ajapunktis ehk ühes milliliitris viirusvarus sisaldunud infektsiooniliste osakeste hulk.

Kasvukõverate võrdlusest selgub, et kõik viirused jõuavad 48 tunni jooksul peaaegu sama tiitriga platoole. Esimese 24 tunni paljunemisdünaamikas esineb aga märgatavaid erinevusi. Kohe algusest tõuseb metsiktüüpi SFVga peaaegu samas joones CHIKV-makro tiitri graafik. Veidi aeglasemalt suurenevad SINV-makro ja CHIKV-NTD tiitrid, kusjuures viimase tiiter on lõpuks CHIKV-makro omast suuremgi. Ka SINV-NTD tiitri graafik on eelmistega suhteliselt sarnane, kuigi alguses veidi madalamal. CHIKV-nsP2 tiiter tõuseb esimese ööpäeva jooksul teistest aeglasemalt ja kõige madalamal on CHIKV-Pro kasvukõvera graafik, mis jõuab teistega samasugusele platoole alles 48 tundi pärast nakatamist. Sellise platoo olemasolu võib viidata sellele, et kuigi infektsiooni alguses häirib teisest viirusest pärit domeeni kaasamine replikaasi kompleksi vajalike interaktsioonide teket kompleksis, tekivad viiruse genoomis suhteliselt kiiresti – esimeste replikatsioonitsükli käigus – neid häiringuid neutraliseerivad kompensatoorsed mutatsioonid. Kuna alfaviirused on RNA-viirused, tekib nende genoomis spontaanseid mutatsioone väga suure sagedusega (Drake jt, 1998), nii et vajalikud kompensatoorsed mutatsioonid võisid suure tõenäosusega selle lühikese aja ja vaid mõne replikatsioonitsükli jooksul viiruste genoomi ilmuda ja tänu paljunemiseelisele viirusepopulatsioonis ülekaalu saavutada.

Kasvukõverate järgi on jälle edukaimad CHIKV-makro ja CHIKV-NTD ja järgmisena SINV vastavate domeenidega kimäärid. See võib viidata taaskord eelpool pakutud võimalusele, et nende domeenide täpne järjestus ei ole alfaviiruste replikaasi töös väga oluline. Kummalgi domeenil pole kirjeldatud konkreetseid ensümaatilisi funktsioone – makro-domeeni ülesanne on teadmata ja N-terminaalne domeen abistab arvatavasti nsP2 teisi osi ehk proteaasi ja helikaasi (Lulla jt, 2012; Das jt, 2014), nii et raske on ennustada ka seda, millist etappi alfaviiruste replikatsioonis nende domeenide vahetamine täpsemalt mõjutab. Samas pole makro-domeeni ja NTD *swapping* täiesti ilma mõjuta SFV elujõulisusele: enamikes katsetes on wt viirus siiski *swap*-viirustest edukam. Seega nõrgestab domeeni muutmine viirust, mis on aga loogiline, sest replikaasi kompleksi funktsionaalse struktuuri moodustumises on olulised arvatavasti paljud seni teadmata interaktsioonid paljude üksikute aminohapete vahel ja nende aminohapete muutmine toob kindlasti kaasa muutusi replikaasi ülesehituses. Nendes interaktsioonides osalevad katsete tulemuste kohaselt kindlasti ka NTD ja makro-domeen, mille täpsemat ülesannet alfaviiruste replikatsioonitsükli tasuks kindlasti edasi uurida. CHIKV-nsP2 ja CHIKV-Pro on elujõulistest viirustest aeglaseima paljunemisega ja väikseima nakatamisvõimega, mis tuleneb oletatavalt proteaasi domeeni täpse järjestuse olulisusest replikaasi töös; seda oletust toetab ka vastavate domeenide SINV *swap*'ide nakatamis- ja paljunemisvõimeetus. Kasvukõverate analüüsist ja mõne eelneva katse tulemusest ilmneb veel asjaolu, et CHIKV-Pro, mille vahetatud domeen on CHIKV-nsP2-st väiksem, tundub olevat viimasest isegi nõrgem. Põhjus võib olla selles, et täispikk välja vahetatud valk ühest viirusest funktsioneerib ehk paremini kui lühem domeen, mis on ainult osa terviklikust valgust. nsP2 osadomeenid interakteeruvad lisaks teistele replikaasi valkudele rohkem või vähem ka omavahel – eelpool toodi välja näiteks NTD oletatav abistav funktsioon proteaasi ja helikaasi töös. On võimalik, et SFV N-terminaalne domeen ja teised replikaasi valgud ei suuda Chikungunya viiruse proteaasi vajalikul määral toetada ja kahest eri viirusest pärit domeenidest kokku pandud nsP2 langetabki CHIKV-Pro elujõulisust.

Swap-mutantsete viiruste edasiseks uurimiseks adapteeriti algselt vähemvirulentseid viiruseid ja uuriti adaptatsiooni käigus tekkinud kompensatoorseid mutatsioone ja nende mõju viiruste elujõulisusele.

3.3. Vähevirentsete viiruste adapteerimise käigus tekkinud kompensatoorsete mutatsioonide uurimine

Viiruste adapteerimine

CHIKV-Pro, CHIKV-nsP2, SINV-makro ja SINV-NTD võeti järgmistesse katsetesse, et uurida algselt suhteliselt nõrkade kimäärade omaduste muutumist adaptatsiooni tulemusena. SINV-

Pro-d ja SINV-nsP2-te ei kaasatud, kuna need viirused ei nakatanud rakke ja samuti jäeti välja CHIKV-NTD ja CHIKV-makro, sest vastavate domeenide vahetamisel ei olnud viiruse elujõulisusele erilist mõju – nende viiruste mitme katse tulemused olid võrdväärsed metsiktüüpi SFV omadustega ja sellest võib oletada, et kompensatsiooniks vajalikud mutatsioonid, kui neid üldse oli, tekkisid juba esmase replikatsioonitsükli käigus ja viiruste paljunemisedukus on jõudnud juba maksimaliseeruda.

4 *swap*-viirust, mida sooviti adapteerida, olid niisiis CHIKV-nsP2, CHIKV-Pro, SINV-NTD ja SINV-makro. Adapteerimiseks nakatati BHK-21 rakke nende mutantide esmaste viirusvarudega. Viirusi adapteeriti nelja tsükli käigus ja pärast viiendat nakatamist koguti ühest nähtava tsütopaatilise efektiga lahjendusest viirusvaru. Protsessi tulemused on näidatud tabelis 3.

Tabel 3. *Swap*-mutantsete viiruste adapteerimise tulemused. Tabelis on välja toodud iga adaptatsioonitsükli puhul väikseim viirusvaru sisaldus nakatussegus ehk suurim lahjendus, kus oli jälgitav tsütopaatiline efekt. Lahjenduste suurenemine adapteerimise käigus viitab viiruse kohasuse tõusule.

| tsükkel\viirus | CHIKV-nsP2 | CHIKV-Pro | SINV-NTD | SINV-makro |
|-----------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| I | 10^{-2} µl | 10^0 µl | 10^{-3} µl | 10^{-4} µl |
| II | 10^{-2} µl | 10^0 µl | 10^{-3} µl | 10^{-4} µl |
| III | 10^{-2} µl | 10^{-1} µl | 10^{-3} µl | 10^{-4} µl |
| IV | 10^{-3} µl | 10^{-2} µl | 10^{-4} µl | 10^{-4} µl |

Tabelist näeb, et viirused adapteerusid protseduuri käigus, sest lahjendused, kus tsütopaatilist efekti märgata oli, suurenesid tsüklitega. Ainukesena ei esinenud sellist trendi SINV-makro puhul, mis on aga tingitud sellest, et CPE ilmnes kohe esimesest tsüklist peale kõige väiksema viirusvaru sisaldusega lahjenduses. Teisisõnu polnud viirusel võimalik enam paremaks adapteeruda, sest selliste katseparameetrite juures oli maksimaalne nakatamis- ja paljunemisvõime juba saavutatud. Võib oletada, et kuna adapteerumine toimus väga kiiresti – esimese tsükliga –, tekkisid paljunemisedukust tõstvad mutatsioonid juba eksperimendi alguses esimeste replikatsioonitsüklitega. Seda saaks kontrollida uute katsetega, kus võiks võrrelda esmast viirusvaru ja pärast igat adaptatsioonitsüklit kogutud viirusvarusid, sekveneerides näiteks üksikutest kloonidest eraldatud geneetilist materjali. Ka teised viirused olid kohanemises suhteliselt edukad: sama tulemuseni ehk suurimas lahjenduses tsütopaatilise efekti tekitamiseni jõudis ka teine Sindbise kimäär SINV-NTD. CHIKV-nsP2 suutis sarnaselt SINV-NTD-ga CPE-d tekitada suurusjärgu võrra väiksema viirusvaru sisaldusega augus alles viimases tsükli. CHIKV-Pro nähtava tsütopaatilise efektiga lahjendused olid küll teiste viiruste

omadest väiksemad, kuid siiski adapteerus ka see mutant ja seda isegi kahes järjestikuses tsüklis.

Kompensatoorsete mutatsioonide uurimine

Et mõista paremini adapteerumismehhanismide tagamaid, isoleeriti adapteeritud viirustest üksikud kloonid, mille mittestruktuurseid valke kodeeriv genoomi osa sekveneeriti võimalike kompensatoorsete mutatsioonide kindlaks tegemiseks. Selleks nakatati BHK-21 rakke adapteeritud viiruste viimasena kogutud viirusevarudega ja lasti tekkida lüüsilaukudel. Eeldusel, et ühe lüüsilauigu moodustab ühe viiruseklooni geneetiliselt identne järglaskond, puhastati lüüsilaukudest puhastamise meetodiga agarit sisaldavast söötimest välja iga *swap*-viiruse kohta umbes 20 viiruseklooni. Nendest 20-st omakorda neljast eraldati RNA, millelt tehti pöördtranskriptsioon-PCR mittestruktuurseid valke kodeerivat genoomipiirkonda katvate praimeritega. Kokku 16 kloonist sekveneeriti uuritav genoomiala mõlemas suunas, kasutades samu praimereid. Mõlemas ahelas koosinenud unikaalsed kompensatoorsete mutatsioonide kombinatsioonid on koos kloonile määratud järjekorranumbriga välja toodud tabelis 4. Paljud kombinatsioonid esinesid mitmes kloonis ja see on samuti tabelisse märgitud.

Nagu tabelist näha, leidus mitmeid mutatsioone, mis esinesid mitmes sama domeeni *swap*-kloonis või isegi erinevate võõra domeeniga viirustes koos. Oli mutatsioone nii vahetatud domeenis kui teistes mittestruktuursetes valkudes. Chikungunya viiruse *swap*-ides oli erinevaid mutatsioone rohkem, kusjuures ühenukleotiidiliste asenduste kõrval leidus ka üks terve aminohappejäägi deletsioon. Kuna need CHIKV-st võetud domeenidega viirused olid SINV kimäärdest madalama paljunemisedukusega, võibki sellest suuremast domeeni vahetamise häirivast mõjust tuleneda rohkemate kompensatoorsete mutatsioonide vajadus. Eelmiste katsete põhjal püstitatud oletust, et CHIKV-Pro on CHIKV-nsP2-st nõrgem, adapteerimise tulemused siiski selgelt ei kinnita. Mõned mutatsioonid olid väga sagedased, näiteks G->A 7371 nsP4-s esines kokku seitsmes Chikungunya *swap*-kloonis; samamoodi oli näiteks NTD 1914. positsiooni C->T olemas kõigis SINV-NTD kimäärides. Samas ei saa öelda midagi kindlat mutatsioonide iseloomu ja mõju kohta, sest konkreetsete aminohapete vahelised interaktsioonid alfaviiruste replikaasis on suures osas veel teadmata ja leitud asendustel ei pruugi olla mingitki kasulikku ega kahjulikku efekti viiruse funktsioneerimisele. Ka on viiruste, eriti RNA-viiruste hulgas väga suur loomulik mutatsioonisagedus (Drake jt, 1998), millest enamikud on nagu ka teistes organismides loomult neutraalsed. Seda võivad suure tõenäosusega olla needki *swap*-viiruste mutatsioonid. Samas on näidatud, et RNA-viiruste puhul on ebaharilikult suur osa kõigist mutatsioonidest pigem kasulikud (Sanjuan jt, 2004), nii et pole võimatu, et antud töös leitud asendused seda samuti on.

Tabel 4. Adapteeritud viirusekloonides leitud mutatsioonikombinatsioonid. Näidatud on kloori(de) number, aminohappejääkide muutusi põhjustavate mutatsioonide positsioonid nukleotiidses järjestuses, muutunud nukleotiidi- ja aminohappejäägid ning mutatsioonide asukohad mittestruktuurseid valke kodeerivas genoomialas.

| Viirus | Nr | Muutused | Asukoht nsP-des |
|-------------------|------------------------|--|-------------------------------------|
| CHIKV-Pro | 1 | G->T 1700, Val->Phe | nsP2 |
| | 2 | G->A 3074, Gly->Ser G->A 7371, Arg->Lys | Pro nsP4 |
| | 3 | G->T 1700, Val->Phe G->A 3074, Gly->Ser | nsP2 Pro |
| | 4 | G->A 3074, Gly->Ser G->A 7371, Arg->Lys | Pro nsP4 |
| CHIKV-nsP2 | 5 | G->A 2378, Glu->Arg C->T 4083, Ala->Val 3 nt deletsioon ($\Delta\Delta\Delta$) 4094, Ala G->C 6987, Cys->Tyr G->A 7371, Arg->Lys | NTD nsP2 nsP3 nsP4 nsP4 |
| | 6 | G->A 2378, Glu->Arg C->T 4083, Ala->Val $\Delta\Delta\Delta$ 4094, Ala G->A 7371, Arg->Lys | NTD nsP2 nsP3 nsP4 |
| | 7 | G->C 6987, Cys->Tyr G->A 7371, Arg->Lys | nsP4 nsP4 |
| | 8 | G->A 7371, Arg->Lys | nsP4 |
| SINV-NTD | 9 | C->T 1914, Ala->Val | NTD |
| | 10 11 | A->T 5337, Lys->Met | nsP3 |
| | 12 | C->T 1914, Ala->Val | NTD |
| SINV-makro | 13 | T->A 3240, Val->Glu | nsP2 |
| | 14 | | |
| | 15 | | |
| | 16 | | |

Järgmiseks sammuks ja edasiseks uurimissuunaks nende mutatsioonide mõtestamisel oleks nende asenduste ja/või erinevate kombinatsioonide viimine algsetesse nii *swap*- kui wt viirustesse ja nende muutuste mõju uurimine viiruse elujõulisusele, infektsioonidünaamikale ja muudele näitajatele. Samuti võib uurida lähemalt näiteks selliselt muteeritud mittestruktuursete valkude ensümaatilist aktiivsust võrreldes metsiktüüpi valkudega. Selliselt saaks homoloogsete domeenide vahetamise meetodiga leitud infot integreerida juba pikka aega kasutusel olnud väiksemahuliste mutatsioonide mõju uurimise meetodiga, mida on *swapping*'uga lühidalt

võrreldud kirjanduse ülevaate osas. Konkreetsetelt nende leitud asenduste edasi analüüsimiseks oleks see levinud meetod väga sobiv.

Selle töö raames kontrolliti veel nende unikaalsete mutatsioonikombinatsioonidega kloonide elujõulisust, nakatades rakke pärast adaptatsiooni kogutud viirusvarudega lüüsilaik-tiitrimiseks.

3.4. Mutatsioonikombinatsioonide seotus konkreetsete viirusekloonide elujõulisusega

Tiitrimiseks ei võetud kõiki kloonide, kuna leidis mitmeid identsete mutatsioonikombinatsioonidega viiruseid. BHK-21 rakke nakatati niisiis viirusvarudega kloonidelt numbritega 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12 ja 13. Tiitrimise tulemused ehk viirusvarus sisaldunud infektsiooniliste osakeste hulk koos lüüsilaikude kuju ja suuruse kirjeldusega on esitatud tabelis 5.

Tabel 5. Adapteeritud ja sekveneeritud viirusekloonide varude tiitrimise tulemused. Näidatud on *swap*-viiruse nimi, number, tiiter ja lüüsilaikude suurus ning kuju kirjeldus.

| Viirus | nr | tiiter pfu/ml | lüüsilaikude suurus/kuju |
|------------|----|--------------------|---|
| CHIKV-Pro | 1 | $7,3 \times 10^7$ | keskmised, ümarad |
| | 3 | $1,5 \times 10^8$ | |
| | 4 | $6,3 \times 10^7$ | |
| CHIKV-nsP2 | 5 | $1,17 \times 10^8$ | väiksed/keskmised, ümarad, veidi korrapäratud |
| | 6 | $1,63 \times 10^8$ | |
| | 7 | 6×10^7 | väiksed, korrapäratud |
| | 8 | $5,15 \times 10^7$ | |
| SINV-NTD | 9 | $9,44 \times 10^7$ | väiksed, nurgelised |
| | 12 | $1,92 \times 10^8$ | |
| SINV-makro | 13 | $5,4 \times 10^8$ | väiksed/keskmised, täkkelised |

Kõigi viiruste tiiter oli suhteliselt sarnane, jäädes 10^8 pfu/ml ümbrusesse. Kõrgeim tiiter oli SINV-makro nr 13-l, mis ka adapteerus kõige kiiremini. Teised SINV *swap*-id olid suhteliselt sarnase tiitriga olenemata konkreetsest mutatsioonikombinatsioonist. Sama võib öelda ka CHIKV-Pro erinevate kloonide kohta, kusjuures CHIKV-Pro puhul olid adapteerunud viiruste lüüsilaigud ümarad, kuid esmaste viirusvarude tiitrimisel tekkisid pigem korrapäratud, aga mitte ümmargused lüüsilaigud. Ka see võib olla märk viiruse paremast kohanemisest, sest

ümarad lüüsilaid on iseloomulikud wt SFV-le. CHIKV-nsP2 kloonide tiitrimisel ilmnes kahte gruppi jaotumine, mis põhines lüüsilaidude morfoloogial ja tiitri väärtusel. Kloonid nr 5 ja 6 olid kõrgema tiitriga, ümaramad ja veidi suuremad kloonidest 7 ja 8. Võrreldes neid andmeid mutatsioonide asukohtade tabeliga, võib märgata võimalikku seost kompensatoorsete asenduste hulga ja suurema paljunemisedukuse vahel. Samas ei ole nende kahe grupi tiitrid niivõrd erinevad, et seda saaks kindlalt väita. Jällegi ei saa antud katse tulemuste põhjal midagi eeldada konkreetsete mutatsioonide mõju või kasulikkuse kohta – eelise võis anda näiteks üks üksik mutatsioon või hoopis paljude mutatsioonide kuhjumine ja koostöö. Et uurida täpsemalt leitud asenduste tagamaid, tasub pöörduda eelnevalt välja pakutud üksikute mutatsioonide indutseerimise meetodi juurde.

Eriti RNA-viiruste suure mutatsioonisageduse valguses võib aga hinnata, et tegelikult tekkis kompensatoorseid mutatsioone ootamatult vähe. Võrdluseks saab näitena välja tuua eksperimendi, kus üheaminohappeliste muudatuste või deletsioonide vastuseks tekkis SFV genoomis ühes kloonis üks või kaks kompensatoorset mutatsiooni (Žusinaite jt, 2007). On küll näidatud, et *swapping*'u puhul ei pruugigi eriti paljusid neutraliseerivaid muutusi tekkida (Reichmann jt, 2005), kuid kuna terve domeeni vahetamine, seda enam, et olulise või kaugest sugulasest pärit, häiris antud viiruste elujõulisust siiski märgatavalt ja adapteerumine toimus küllaltki kiiresti, võiks oletada, et sellise eduka kohanemise põhjus võiks olla mitme olulise kompensatoorse asenduse teke. Samas oli näiteks SINV-makro kõigis kloonides vaid üks aminohappeline asendus, mida on üllatavalt vähe, et anda sellist eelist nakatamises ja paljunemises, kui see asendus üldse kasulik oligi. Seda tähelepanekut võib mingil määral seletada organiseerimata struktuuriga valkude teooriaga (*intrinsically disordered proteins*). Nimelt on mitmed valkude struktuuri uurijad avastanud, et viiruste, eriti aga RNA-viiruste valgud on suures osas kindla struktuurita – valgus on vähe kompaktseid ja tihedate sidemetega piirkondi, pigem on ülekaalus lõdvalt seotud alad (Tokuriki jt, 2008; Xue jt, 2010). Sellistel valkudel võib olla mitmeid eeliseid just viiruste eluviisi kontekstis: lõdvem struktuur annab valgule plastilisuse, mis võib olla abiks näiteks konkreetse ensümaatilise funktsiooni täitmisel või rakuliste valkudega interakteerumisel, sest valk ei ole teiste molekulide ligipääsemise jaoks üleliia kompaktne. Samuti saavad ka replikaasi kompleksi valgud omavahel paremini interakteeruda ja efektiivsemalt oma ülesehitust muuta, kui näiteks varasest replikaasist protsessitakse hiline ja kui kompleksi ülesanded kiirelt vahetuvad. Paljudes teisteski funktsionaalsetes valgukompleksides on leitud selline pigem nõrgemalt seotud ja väheste interaktsioonidega struktuur (Tomba ja Fuxreiter, 2008). Uuringud seostavad organiseerimata struktuuriga valke paljude inimese haigustega (Uversky jt, 2008) ja kuna neid on palju ka

viirustes, on see väga oluline uus uurimissuund nii molekulaarbioloogilisest kui biomeditsiinilisest seisukohast.

Hõredate sidemetega valkude ülekaal annab kõrge loomuliku mutatsioonisagedusega RNA-viirustele hea vastupanu destabiliseerivatele mutatsioonidele, sest aminohapete vahelisi tugevaid sidemeid on vähe ja igal mutatsioonil on kogu valgule väike mõju (Tokuriki jt, 2008). Võib-olla tulenebki sellest RNA-viiruste ebatavaliselt kõrge kasulike mutatsioonide osakaal, mida eelpool puudutati. Midagi sellist võis toimuda ka *swap*-mutantsete viirustega – loomulik vastupanu mutatsioonidele võimaldas nendel suurte võõrast viirusest pärit valguosadega kimääridel edukalt paljuneda ja kõrge mutatsioonisagedus, mille destabiliseerivaid mõjusid viirusevalgud neutraliseerivad, andis materjali adapteerumiseks. Praegu jääb see siiski vaid oletuseks, seda enam, et *swapping* põhjustas märgatavaid negatiivseid tagajärgi mitme viiruse elujõulisusele ja konkreetsete järelduste tegemiseks on replikaasi struktuurist veel liiga vähe teada. Organiseerimata struktuuriga valke tasuks kindlasti edasi uurida ja seostada mitte ainult alfaviiruste replikaasiga, vaid kõigi viiruste proteiinidega üldiselt, sest selles teoorias võib leida oluline eeldus erinevate valgukomplekside struktuuri ja täpse töömehhanismi kindlaks tegemiseks.

3.5. Homoloogsete domeenide vahetamise meetodi informatiivsus viroloogilistes uurimustes

Homoloogsete domeenide vahetamine ehk *swapping* andis antud töös võimalikku infot replikaasi valkude erinevate domeenide järjestuse täpsuse olulisuse kohta. Samuti sai *swap*-viiruste edukuse alusel teha oletusi erinevate alfaviiruste erinevate domeenide ja ensüümide – näiteks proteaasi – funktsioneerimise kohta teises viiruseliigis. Viiruste erinevates katsetes võrdlemise tulemuste põhjal võis pakkuda välja palju uusi uurimissuundi ja meetodeid ilmnunud nähtuste tagamaade leidmiseks. Kuna selles töös kasutatud kimäärid on vaid väike valik kõigist võimalikest kombinatsioonidest nii alfaviiruste kui üldiselt kõigi viiruste vahel, saab samalaadsete uurimustega leida suurel hulgal edasi analüüsimist väärtavaid efekte, mis *swap*-mutantsete viiruste elutsükliks ilmnevad. Ka seni tehtud seda meetodit kasutanud uurimused on olnud mitmekesised ja jõudnud huvitavate järeldusteni, mis tõestavad veelgi meetodi laialdast kasutusväärtust ja -võimalust. Võib öelda, et viroloogias on *swapping* väga laia rakendusala meetod, mis annab palju materjali põhjalikemaks mitmekülgseltks uuringuteks.

KOKKUVÕTE

Töö eesmärgiks oli võrrelda konstrueeritud *swap*-mutantsete viiruste elujõulisust ja selle põhjal iseloomustada alfaviiruste replikaasi osade tähtsust ja rolli kompleksi töös. Saadud tulemustest lähtuvalt sooviti analüüsida valkude homoloogsete domeenide vahetamise meetodi informatiivsust viroloogias.

Kaheksa vahetatud domeenidega viiruse uurimisel ilmnas mitmeid huvitavaid tulemusi, mida tõlgendades pakuti välja oletusi alfaviiruste replikaasi valkude interaktsioonide kohta. Esiteks järelitati nelja vahetatud proteaasiga viiruse vähesest elujõulisusest, et alfaviiruste proteaasi täpne järjestus on viiruse replikatsiooni korrektseks toimimiseks suhteliselt oluline. Samas ei ole nii tähtis makro- ja N-terminaalse domeeni järjestus, sest nende domeenidega viirused olid üldiselt teistest edukamad. Need domeenid osalevad aga kindlasti replikaasi töös, sest nende vahetamine mõjutas vastavaid *swap*-viiruseid negatiivselt. Üldiselt oli CHIKV domeenidega viiruste replikatsiooni- ja naktamisvõime suurem SINV-*swap*'idest, mis näitab, et fülogeneetiliselt lähedasemalt viiruselt võetud domeen funktsioneerib teiste valkudega koos paremini võrreldes kauge sugulase domeeniga. Ühe võimalusena pakuti veel välja, et ühest viirusest võetud täispikk valk, mis koosneb omavahel interakteeruvatest domeenidest, võib võõras viiruses toimida paremini kui üksik lühem domeen, mis oma ensümaatilise funktsiooni täitmiseks vajab teisi sobivaid abivalke ehk sama valgu teisi domeene.

Vähemedukate viiruste adapteerimisel selgus, et viirused saavutasid suurema kohasuse suhteliselt kiiresti ja ootamatult vähese hulga kompensatoorsete mutatsioonide abil. See võib tuleneda viirusvalkude suures osas organiseerimata struktuurist – valgusiseseid tihedaid interaktsioone on vähe, mis annab valgule plastilisuse oma funktsiooni täitmisel ja omamoodi kaitsemehhanismi mutatsioonide vastu.

Homoloogsete domeenide vahetamisega saadi palju materjali edasisteks lähemateks uuringuteks. Mutantsete viiruste võrdlemisel märgatud nähtuste tagapõhja, näiteks kompensatoorsete mutatsioonide tegelikku mõju, võib täpsemalt analüüsida väga erinevate meetoditega. Samuti võib antud uurimuses kogutud informatsiooni rakendada uute *swapping*'ut kasutavate tööde planeerimisel.

Studying the structure of the alphaviral replicase complex by homologous domain swapping

Mona Teppor

SUMMARY

Alphaviruses belong to the *Togaviridae* family of viruses and have a positive-sense single-stranded RNA genome. Many members of the genus *Alphavirus* infect fishes, birds, and mammals, including humans, and are transmitted by insect vectors. They are good model viruses for studying different biological processes, especially viral replication and infection.

The alphaviral replicase complex, which is responsible for RNA transcription and replication, is the key for understanding the life cycle of alphaviruses. The enzymatic properties of the individual proteins nsP1–4 that the complex is comprised of are understood and described quite well. The interactions between the proteins and the exact replication mechanism, however, still remain mostly unknown. Previously, most of the research studying the structure of the replicase has used the method of inducing individual small-scale mutations in the nsP coding region of the genome, and analyzing the effect of those mutations. Unfortunately, identifying the specific nucleotides in the genome where the mutations should be made to yield useful results is time-consuming and complicated. This study used homologous domain swapping to examine the importance and role of different replicase protein domains in alphaviral replication. Domain swapping occurs widely in the natural environment, and is an important driving force of evolution. In virology this method is useful for understanding the function of viral domains and also for biomedical purposes, e.g. constructing vaccines from parts of different viruses.

The aim of the study was to compare the viability of 8 mutant Semliki Forest virus constructs with swapped homologous domains from related alphaviruses (Chikungunya virus and Sindbis virus), and use the results to describe the importance and role of different replicase domains. Another aim was to analyze the informativity of the domain swapping method in virological research.

Several experiments were carried out to study the viability, virulence, replication efficiency and adaptation mechanisms of different chimaeric swap-viruses. As the results of these experiments, many interesting phenomena occurred, and they certainly should be investigated more thoroughly to find the exact meaning of some of the findings, for example the effect of the compensatory mutations that occurred.

Overall, it was proposed that:

- the precise sequence of the alphaviral protease is very important in effective replication;
- the precise sequence of the macro and N-terminal domains is not as vital for investigated alphaviruses;
- a full-length swapped protein might be more functional in conducting its enzymatic activities than a smaller part of that protein without specific supportive domains;
- the proteins of alphaviruses may be intrinsically disordered, so that they have a higher tolerance for mutations and are more plastic when performing their purposes.

Homologous domain swapping proved to be a very useful method in terms of providing information for studies that are more specific and in-depth. The results of the study can be used for conducting further investigations of the structure of the alphaviral replicase complex or for planning new similar studies.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Ahola, T., Laakkonen, P., Vihinen, H., Kääriäinen, L. (1997). Critical residues of Semliki Forest virus RNA capping enzyme involved in methyltransferase and guanylyltransferase-like activities. *Journal of virology*. 71: 392–97.
- Ahola, T., Lampio, A., Auvinen, P., Kääriäinen, L. (1999). Semliki Forest virus mRNA capping enzyme requires association with anionic membrane phospholipids for activity. *EMBO Journal*. 18: 3164–72.
- Das, P.K., Merits, A. and Lulla, A. (2014). Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. *J Biol Chem*. 289: 5635–53.
- de Groot, R. J., Rümenapf, T., Kuhn, R. J., Strauss, E. G. and Strauss, J. H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 88: 8967–71.
- Ding, M. And Schlesinger, M. J. (1989). Evidence that Sindbis Virus NSP2 Is an Autoprotease Which Processes the Virus Nonstructural Polyprotein. *Virology*. 171: 280–4.
- Drake, J. W., Charlesworth, C., Charlesworth, D. and Crow, J. F. (1998). Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*. 148: 1667–86.
- Frolov, I., Agapov, E., Hoffman, T. A., Pragai, B. M., Lipka, M., Schlesinger, S. and Rice, C. M. (1999). Selection of RNA replicons capable of persistent noncytopathic replication in mammalian cells. *J Virol*. 73: 3854–65.
- Frolova, E., Frolov, I. and Schlesinger, S. (1997). Packaging signals in alphaviruses. *J Virol*. 71: 248–58.
- Froshauer, S., Kartenbeck, J. and Helenius A. (1988). Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*. 107: 2075–86.
- Garoff, H., Huylebroeck, D., Robinson, A., Tillman, U. and Liljeström, P. (1990). The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. *JCB*. 111: 867–76.
- Gomez de Cedrón, M., Ehsani, N., Mikkola, M. L., Garcia, J. A. and Kääriäinen, L. (1999). RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Letters*. 448: 19–22.

- Gonda, D. K., Bachmair, A., Wüning, I., Tobias, J. W., Lane, W. S. and Varshavsky, A. (1989). Universality and structure of the N-end rule. *Journal of Biological Chemistry*. 264: 16700–12.
- Helenius, A., Kartenbeck, J., Simons, K. and Fries, E. (1980). On the entry of semliki forest virus into BHK-21 cells. *JCB*. 84: 404–20.
- Kamer, G. and Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*. 12: 7269–82.
- Kim, D. Y., Firth, A. E., Atasheva, S., Frolova, E. I. and Frolov, I. (2011). Conservation of a Packaging Signal and the Viral Genome RNA Packaging Mechanism in Alphavirus Evolution. *J Virol*. 85: 8022–36.
- Kujala, P., Ikäheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P. and Kääriäinen, L. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *J Virol*. 75: 3873–84.
- Kääriäinen, L. and Ranki, M. (1984). Inhibition of cell functions by RNA-virus infections. *Annual Review of Microbiology*. 38: 91–109.
- Liljeström, P. and Garoff, H. (1991). Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *J Virol*. 65: 147–54.
- Loewy, A., Smyth, J., von Bonsdorff, C. H., Liljeström, P. and Schlesinger, M. J. (1995). The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *J Virol*. 69: 469–75.
- Lu, Y. and Kielian, M. (2000). Semliki Forest Virus Budding: Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement. *J Virol*. 74 : 7708–19.
- Luers, A. J., Adams, S. D., Smalley, J. V. and Campanella, J. J. (2005). A phylogenomic study of the genus Alphavirus employing whole genome comparison. *Comparative and Functional Genomics*. 6: 217–27.
- Lulla, A., Lulla, V. And Merits, A. (2012). Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein. *J Virol*. 86: 553–65.
- Marsh, M., Bolzau, E. and Helenius, A. (1983). Penetration of Semliki Forest Virus from Acidic Prelysosomal Vacuoles. *Cell*. 32: 931–40.
- Melancon, P. and Garoff, H. (1987). Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *J Virol*. 61: 51301–9.

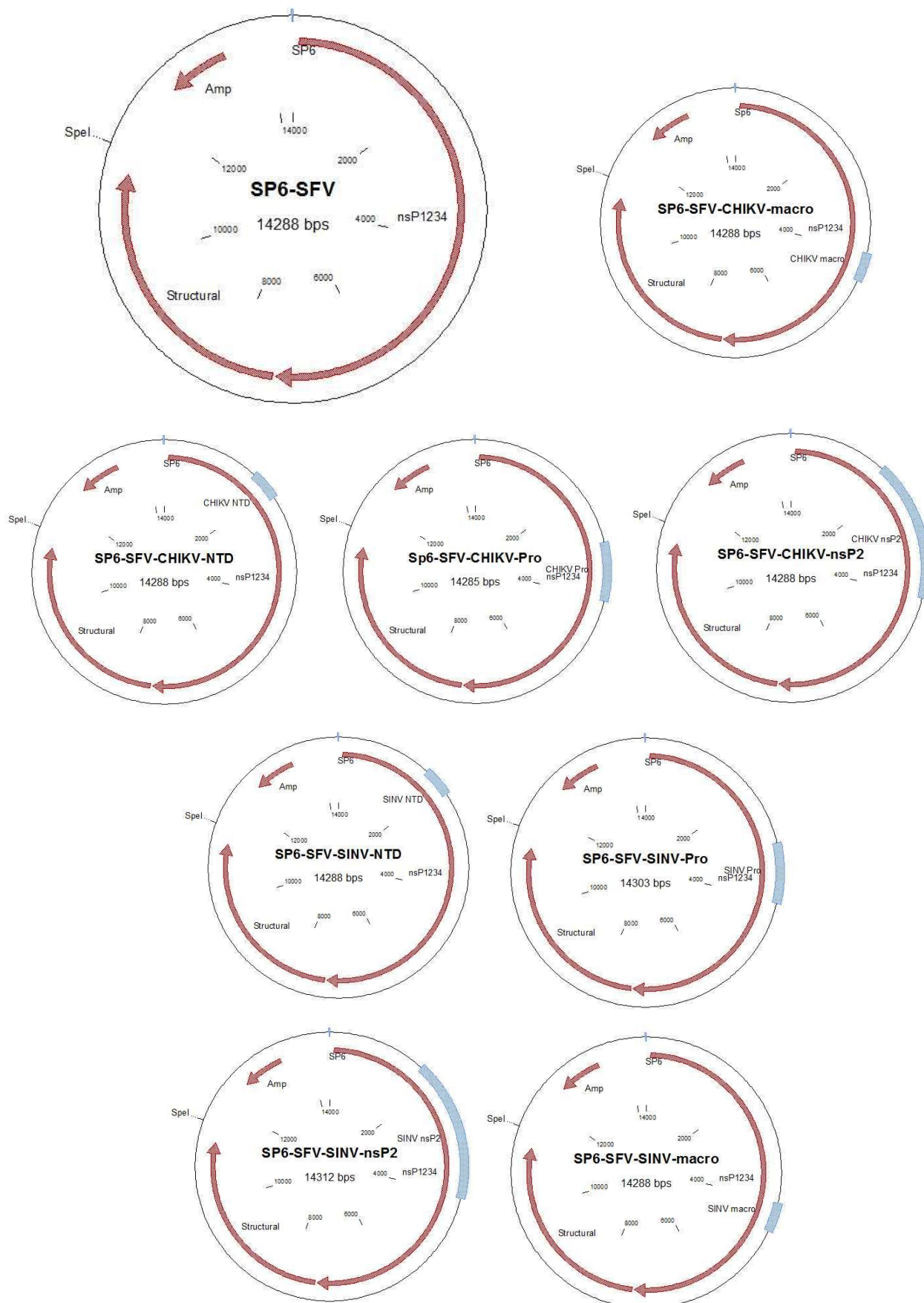
- Merits, A., Vasiljeva, L., Ahola, T., Kääriäinen, L. and Auvinen, P. (2001). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein by nsP2 protease. *The Journal of General Virology*. 82: 765–73.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. and Schätzl, H. (2013). Viruses with Single-Stranded, Positive-Sense RNA Genomes, p. 437–520. In S. Modrow, D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl, *Molecular Virology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ostermeier, M. And Benkovic, S. J. (2001). Evolution of protein function by domain swapping, p. 29–42. In F. H. Arnold, *Evolutionary protein design*, vol. 55. Academic Press, San Diego, USA.
- Park, E. and Griffin, D. E. (2009). The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology*. 388: 305–14.
- Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1991). Biogenesis of type I cytopathic vacuoles in Semliki Forest virus-infected BHK cells. *J Virol*. 65: 1623–7.
- Peränen, J., Takkinen, K., Kalkkinen, N. and Kääriäinen, L. (1988). Semliki Forest virus-specific non-structural protein nsP3 is a phosphoprotein. *J Gen Virol*. 69: 2165–78.
- Reichmann, D., Rahat O., Albeck, S., Meged, R., Dym, O., and Schreiber, G. (2005). The modular architecture of protein–protein binding interfaces. *PNAS*. 102: 57–62.
- Rikkonen, M., Peranen, J. and Kääriäinen, L. (1992). Nuclear and nucleolar targeting signals of Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology*. 189: 462–73.
- Rikkonen, M., Peränen, J. and Kääriäinen, L. J. (1994). ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Virology*. 68:5804–10.
- Salonen, A., Ahola, T. and Kääriäinen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 285: 139–73.
- Salonen, A., Ahola, T. and Kääriäinen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 285: 139–73.
- Sanjuan, R., Moya, A. and Elena, S. F. (2004). The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *PNAS*. 101: 8396–401.
- Sanz, M. A., Pérez L. and Carrasco L. (1994). Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem*. 269: 12106–10.
- Sawicki, D. L. and Sawicki, S. G. (1980). Short-lived minus-strand polymerase for Semliki Forest virus. *J Virol*. 34: 1108–18.

- Saxton-Shaw, K. D., Ledermann, J. P., Borland, E. M., Stovall, J. L., Mossel, E. C., Singh, A. J., Wilusz, J. and Powers, A. M. (2013). PLoS Neglected Tropical Diseases. 7: e1931.
- Schmaljohn, A. L. and McClain, D. (1996). Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). In S. Baron (ed.), Medical Microbiology, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Schwartz, O. and Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of Chikungunya virus. Nature reviews. Microbiology. 8: 491–500.
- Shirako, Y. and Strauss, J. H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. J Virol. 68: 1874–85.
- Singh, I. and Helenius, A. (1992). Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. J Virol. 66: 7049–58.
- Strauss, E. G., Levinson, R., Rice, C. M., Dalrymple, J. and Strauss, J. H. (1988). Nonstructural Proteins nsP3 and nsP4 of Ross River and O’Nyong-nyong Viruses: Sequence and Comparison with Those of Other Alphaviruses. Virology. 164: 265–74.
- Strauss, J. H. and Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiological Reviews. 58: 491–562.
- Söderlund, H. and Ulmanen, I. (1977). Transient association of Semliki Forest virus capsid protein with ribosomes. J Virol. 24: 907–9.
- Žusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A. and Sarand, I. (2007). Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. J Gen Virol. 88: 1977–85.
- Takkinen, K., Peränen, J. and Kääriäinen, L. (1991). Proteolytic processing of Semliki Forest virus-specific non-structural polyprotein. J Gen Virol. 72: 1627–33.
- Thiboutot, M. M., Kannan, S., Kawalekar, U., Shedlook, J., Khan, A. S., Sarangan, G., Srikanth, P., Weiner, D. B. and Muthumani, K. (2010). Chikungunya: a potentially emerging epidemic? PLoS Neglected Tropical Diseases. 4: e623.
- Tokuriki, N., Oldfield, C. J., Uversky, V., Berezovsky, I. N. and Tawfik, D. S. (2008). Do viral proteins possess unique biophysical features? Trends in Biochemical Sciences. 34: 53–9.
- Tompa, P. and Fuxreiter, M. (2008). Fuzzy complexes: polymorphism and structural disorder in protein–protein interactions. TIBS. 33: 2–8.

- Trifonov, E. N. and Frenkel, Z. M. (2009). Evolution of protein modularity. *Current Opinion in Structural Biology*. 19: 335–40.
- Tuittila, M. T., Santagati, M. G., R  ytt  , M., M   tt  , J. A. and Hinkkanen, A. E. (2000). *J Virol*. 74: 4579–89.
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J. and Dunker, A. K. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: Introducing the d2 concept. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 37: 215–46.
- Wagner, G. P., Pavlicev, M. and Cheverud, J. M. (2007). The road to modularity. *Nature reviews. Genetics*. 8: 921–31.
- Wang, E., Volkova, E., Adams, A. P., Forrester, N., Xiao, S., Frolov, I. and Weaver, S. C. (2008). Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine*. 26: 5030–9.
- Wang, Z. and Zhang, J. (2007). Correction: In Search of the Biological Significance of Modular Structures in Protein Networks. *PLoS Computational Biology*. 3: e146.
- Wang, Y. F., Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L. (1991). Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *J Virol*. 65: 985–8.
- Wang, Y. F., Sawicki, S. G. and Sawicki, D. L. (1994). Alphavirus nsP3 Functions To Form Replication Complexes Transcribing Negative-Strand RNA. *J Virol*. 68: 6466–75.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. and Kääriäinen, L. (2000). Identification of a novel function of the Alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem*. 275: 17281–7.
- Vasiljeva, L., Valmu, L., Kääriäinen, L. and Merits, A. (2001). Site-specific protease activity of the carboxyl-terminal domain of Semliki Forest virus replicase protein nsP2. *J Biol Chem*. 276: 30786–93.
- White, C.L., Thomson, M. and Dimmock, N.J. (1998). Deletion analysis of a defective interfering Semliki Forest virus RNA genome defines a region in the nsP2 sequence that is required for efficient packaging of the genome into virus particles. *J Virol*. 72: 4320–6.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A. and Kääriäinen, L. (2001). Elimination of Phosphorylation Sites of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP3. *J Biol Chem*. 276: 5745–52.
- Xue, B., Williams, R. W., Oldfield, C. J., Goh, G. K., Dunker, A. K. and Uversky, V. N. (2010). Viral Disorder or Disordered Viruses: Do Viral Proteins Possess Unique Features? *Protein & Peptide Letters*. 17: 932–51.

LISAD

Lisa 1. Kasutatud icDNA plasmiidide kaardid



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Mona Teppor,

(sünnikuupäev: 20.09.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Alfaviiruste replikaasi kompleksi struktuuri uurimine valkude homoloogsete domeenide vahetamisega,

mille juhendaja on Eva Žusinaite,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014